

单采献血者 IL-28b 基因多态性与隐匿性 HBV 感染相关性研究

周娟¹, 竺青¹, 孙桂芝¹, 张红卫¹, 郭成山², 贺韦东¹, 陈敏¹

(1. 山东省血液中心机采科, 济南 250014; 2. 深圳市宝安区人民医院, 广东深圳 518101)

摘要: **目的** 研究单采献血者白细胞介素-28b (IL-28b) 基因多态性与隐匿性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染 (OBI) 相关性。**方法** 选择 2016 年 1 月~2019 年 12 月山东省血液中心成功捐献血小板 HbsAg (-)、核酸检测 (NAT) 无反应的献血者 1 158 例为研究对象, 提取献血者血液 DNA, 采用直接测序法进行 IL-28b 基因分型, cobas HBV 定量核酸检测试剂盒检测血液 HBV-DNA 载量, Logistic 回归分析 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 的关系。**结果** 与非 OBI 比较, OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点 G 等位基因频率、TG+GG 基因型频率显著降低, T 等位基因频率、TT 基因型频率显著增加 ($\chi^2=22.137, 22.163$, 均 $P<0.01$); rs12979860 位点 T 等位基因频率、CT+TT 基因型频率显著降低, C 等位基因频率、CC 基因型频率显著增加 ($\chi^2=16.378, 19.091$, 均 $P<0.01$)。OBI 献血者 rs8099917 位点, 与 TT 基因型比较, TG+GG 基因型患者 HBV-DNA 载量显著降低 ($t=5.257, P<0.01$); rs12979860 位点, 与 CC 基因型比较, CT+TT 基因型患者 HBV-DNA 载量显著降低 ($t=17.398, P<0.01$), 以上比较差异均有统计学意义。Logistic 回归分析结果显示, rs8099917 位点, 与 TT 基因型比较, TG+GG 基因型可显著降低 OBI 发生风险 (95% CI: 0.288~0.843, $P<0.05$); rs12979860 位点, 与 CC 基因型比较, CT+TT 基因型可显著降低 OBI 发生风险 (95% CI: 0.207~0.761, $P<0.05$)。**结论** 单采献血者 OBI 可能与 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性有关。

关键词: 单采献血者; 隐匿性乙型肝炎病毒感染; 白细胞介素-28b; 基因多态性

中图分类号: R457.1; R512.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 05-008-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.002

Study on the Correlation between IL-28b Gene Polymorphism and Occult HBV Infection in Platelet Donors

ZHOU Juan¹, ZHU Qing¹, SUN Gui-zhi¹, ZHANG Hong-wei¹, GUO Cheng-shan², HE Wei-dong¹, CHEN Min¹

(1. Department of Mechanical Collection, Shandong Blood Center, Jinan 250014, China;

2. People's Hospital of Bao'an District, Guangdong Shenzhen 518101, China)

Abstract: **Objective** To study the correlation between interleukin-28b (IL-28b) gene polymorphism and occult hepatitis B virus (HBV) infection (OBI) in platelet donors. **Methods** From January 2016 to December 2019, 1 158 platelet donors from Shandong Blood Center who successfully donated platelets with HbsAg (-) and had no response to nucleic acid test (NAT) were selected as the study subjects, DNA was extracted from blood donors, IL-28b was genotyped by direct sequencing, cobas HBV quantitative nucleic acid detection kit was used to detect HBV-DNA load in blood, and Logistic regression was used to analyze the relationships between the polymorphisms of rs8099917, rs12979860 loci on IL-28b gene and OBI. **Results** Compared with non OBI, the G allele frequency and TG + GG genotype frequency at rs8099917 locus on IL-28b gene in OBI donors were significantly lower, while the T allele frequency and TT genotype frequency were significantly higher ($\chi^2=22.137, 22.163$, all $P<0.01$). T allele frequency and CT + TT genotype frequency of rs12979860 were significantly lower, while C allele frequency and CC genotype frequency were significantly higher ($\chi^2=16.378, 19.091$, all $P<0.01$). At rs8099917 locus of OBI donors, HBV-DNA load of TG + GG genotype was significantly lower than that of TT genotype ($t=5.257, P<0.01$). At rs12979860 locus, HBV-DNA load of CT + TT genotype was significantly lower than that of CC genotype ($t=17.398, P<0.01$), and the above differences were statistically significant. Logistic regression analysis showed that, at rs8099917 locus, compared with TT genotype, TG + GG genotype could significantly reduced the risk of OBI (95% CI: 0.288~0.843, $P<0.05$). At rs12979860 locus, compared with CC genotype, compared with CC genotype, CT + TT genotype could significantly reduced the risk of OBI (95%

基金项目: 国家自然科学基金 (NO.81270577)。

作者简介: 周娟 (1972-) 女, 本科, 副主任护师, 研究方向: 机采血小板, 乙肝, 丙肝, 艾滋病, E-mail: zj250014@163.com。

通讯作者: 陈敏 (1977-) 女, 本科, 副主任护师, E-mail: 06130117@163.com。

CI: 0.207~0.761, $P < 0.05$). **Conclusion** OBI of platelet donors may be related to the polymorphisms of rs8099917 and rs12979860 loci on IL-28b gene.

Keywords: platelet donor; occult hepatitis B virus infection; interleukin-28b; gene polymorphism

我国是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染高发区, HBV 感染不仅可导致急性慢性病毒性肝炎, 同时与肝硬化和肝细胞癌的发生发展密切相关, 严重影响人类健康^[1]。隐匿性 HBV 感染 (occult hepatitis B virus infection, OBI) 即血清或肝组织中乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 检测阴性而实时荧光定量 PCR (real-time quantitative, RT-qPCR) 技术检测 HBV 阳性^[2-3]。OBI 是 HBV 感染的一种特殊类型, 可通过输血、器官移植、血液透析等方式传播, 是导致 HBV 感染发生典型乙型肝炎的主要原因之一^[4]。目前研究认为 OBI 可能与 HBV S 基因等基因突变有关^[5], 白细胞介素-28b (interleukin-28b, IL-28b) 是一种重要细胞因子, 在 HBV 感染进程中发挥重要作用, 其基因多态性与乙型肝炎病程密切相关^[6-7], 但关于其 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 的关系尚鲜有研究。因此本研究以单采献血者为研究对象, 探究 OBI 与 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性的关系, 以期对临床 OBI 发生发展机制研究提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 1 月~2019 年 12 月山东省血液中心成功捐献血小板的献血者 1 158 例为研究对象。纳入标准: ①年龄 18~55 岁; ②均经酶免疫检测和核酸检测 HBsAg、丙肝病毒检测 (hepatitis c virus, HCV) 和人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 阴性合格者; ③无血缘关系的本地常住居民; ④至少成功捐献 1 次血小板者。本研究经过山东省血液中心道德伦理委员会批准通过。

1.2 主要仪器及试剂 血清乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)、表面抗体 (hepatitis B surface antibody, HBsAb)、e 抗原 (hepatitis B e antigen, HBeAg)、e 抗体 (hepatitis B e antibody, HBeAb) 和核心抗体 (hepatitis B core antibody, HBcAb), 试剂盒货号: YZB/ 国 3575-2014, 国食药监械 (准) 字 2014 第 3401094 号, 购自深圳迈瑞生物医疗; DNA 提取试剂盒 (货号: DP348) 购自北京雅安达生物技术有限公司; PureLink PCR 纯化试剂盒 (货号: K310001) 购自美国 Thermo Fisher 公司; cobas HBV 定量核酸检测试剂盒购自罗氏公司; 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; Architect 分析仪购自美国雅培公司; 7500 RT-qPCR 仪购自 ThermoFisher 公司等。

1.3 方法

1.3.1 资料收集: 收集每个献血者献血时性别、年龄、体质量指数、献血状态等临床资料及血液标本。

1.3.2 血清学指标检测: 使用 Architect 分析仪采用自动化化学发光酶免疫分析法对献血者进行 HBsAg、抗 HCV 抗体和抗 HIV 抗体检测。使用化学发光免疫分析法对检测结果为阴性的受试者进行 anti-HBs 和 anti-HBc 的进一步检测。anti-HBs ≥ 10.0 mIU/ml 和 anti-HBc ≥ 1.0 s/CO 滴度时为阳性。

1.3.3 DNA 提取及 IL-28b 基因多态性检测: 采用全基因组 DNA 提取试剂盒提取所有献血者血液 DNA, 置于 -20°C 冰箱保存备用。IL-28b 基因 rs 8099917 位点上游引物序列 ($5' \rightarrow 3'$): TTCA CCATCCTCCTCTCATCCCTCAT, 下游引物序列 ($5' \rightarrow 3'$): TCCTAAATTGACGGGCCATCT; rs12979860 位点上游引物序列 ($5' \rightarrow 3'$): CTTAT CGCATACGGCTAGGCGTTTC, 下游引物序列 ($5' \rightarrow 3'$): GGACCGCTACGTAAGTCACC。反应条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 64°C 退火 1 min, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环; 72°C 终延伸 10 min。PCR 产物置于 4°C 保存。采用 DNA 纯化回收试剂盒纯化回收后送上海生工生物工程股份有限公司进行基因测序。

1.3.4 HBV-DNA 病毒载量检测: 采用 cobas HBV 定量核酸检测试剂盒检测献血者血液 HBV-DNA 载量, 具体操作参照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 版软件进行统计学分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示, 采用 χ^2 或 Fisher 确切概率法检验; 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用 t 检验。采用 Pearson χ^2 检验 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点哈代-温伯格 (Hardy-Weinberg) 平衡。采用 Logistic 回归分析影响 OBI 发生的因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

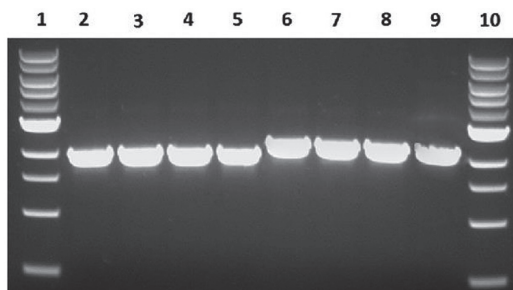
2 结果

2.1 PCR 扩增结果分析 见图 1。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 产物条带单一, 产量高且无明显引物二聚体。

2.2 OBI 与非 OBI 献血者 IL-28b 基因多态性 Hardy-Weinberg 平衡检验 1 158 例单采献血者中 anti-HBs 或 (和) anti-HBc 阳性者 301 例 (25.99%), 其中 18~30 岁 133 例 (11.48%), 31~49 岁 100 例 (8.64%), 50~55 岁 68 例 (5.87%)。进一步

进行 HBV-DNA 检测发现 301 例献血者中 HBV-DNA 阳性即 OBI 者 46 例 (15.28%)，非 OBI 者 255 例 (84.72%)。OBI 与非 OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点基因型分布均符合哈代-温伯格 (Hardy-Weinberg) 平衡定律 ($\chi^2=4.589, 0.812$ 和 $3.535, 4.889, P=0.101, 0.666$ 和 $0.171, 0.087$)，具有群体代表性。

2.3 OBI 与非 OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性 见表 1。与非 OBI 比较，OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点 G 等位基因频率、TG+GG 基因型频率显著降低，T 等位基因频率、TT 基因型频率显著增加 ($P < 0.01$)；rs12979860 位点 T 等位基因频率、CT+TT 基因型频率显著降低，C 等位基因频率、CC 基因型频率显著增加，以上比较差异均有统计学意义。



注：1,10 为 DL Marker 1000；2~5、6~9 分别为不同献血者 rs8099917 位点、rs12979860 位点扩增片段。

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

2.4 OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 HBV-DNA 载量的关系 见表 2。OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 HBV-DNA 载量有关 ($P < 0.01$)，其中 rs8099917 位点，与 TT 基因型比较，TG+GG 基因型患者 HBV-DNA 载量显著降低 ($P < 0.01$)；rs12979860 位点，与 CC 基因型比较，CT+TT 基因型患者 HBV-DNA 载量显著降低 ($P < 0.01$)。

表 3 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 发生 Logistic 回归分析

自变量	β	wald χ^2	SE	OR	95% CI	P
rs8099917	TT	—	—	1.000	—	—
	TG+GG	-0.707	6.663	0.274	0.493	0.010
rs12979860	CC	—	—	1.000	—	—
	CT+TT	-0.924	7.743	0.332	0.397	0.005

3 讨论

近年来尽管随着核酸检测 (nucleic acid testing, NAT) 技术的发展普及，HBsAg (-)/HBV-DNA (+) 血样检出率显著提高，可在一定程度上降低 HBV 输血传播风险，但 NAT 检测存在窗口期，对于感染 HBV 40 天内患者其检出率极低^[8-9]，另 HBV S 基因存在免疫逃逸突变等特点^[10-11]，临床应用存

CT+TT 基因患者 HBV-DNA 载量显著降低，以上比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点等位基因、基因型分布 [% (n)]

基因型		非 OBI (n=225)	非 OBI (n=46)	χ^2	P
rs 8099917	T	321 (62.94)	81 (88.04)	22.137	0.000
	G	189 (37.06)	11 (11.96)		
	TT	109 (42.75)	37 (80.43)	22.163	0.000
	TG+GG	146 (57.25)	9 (19.57)		
rs 12979860	C	322 (63.14)	78 (84.78)	16.378	0.000
	T	188 (36.86)	14 (15.22)		
	CC	105 (41.18)	35 (76.09)	19.091	0.000
	CT+TT	150 (58.82)	11 (23.91)		

表 2 OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 HBV-DNA 载量关系 ($\bar{x} \pm s$)

基因型		<i>n</i>	HBV-DNA (IU/ml)	<i>t</i>	<i>P</i>
rs8099917	TT	37	13.76 ± 1.42	5.257	0.000
	TG+GG	9	11.03 ± 1.29		
rs12979860	CC	35	28.94 ± 2.41	17.398	0.000
	CT+TT	11	15.37 ± 1.63		

2.5 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 发生的关系 见表 3。采用 Logistic 回归分析 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 发生的关系，结果显示，rs8099917 位点，与 TT 基因型比较，TG+GG 基因型可显著降低 OBI 发生风险 ($P < 0.05$)；rs12979860 位点，与 CC 基因型比较，CT+TT 基因型可显著降低 OBI 发生风险 ($P < 0.05$)。

在一定局限。有研究报道，高流行区 70%~90% 人口先前暴露于 HBV 流行区供血者中，OBI 发生率可达 7%~19%，而低流行区也有近 0%~9% OBI 患者^[12-13]。本研究结果显示，1 158 例单采献血者中 anti-HBs 或 (和) anti-HBc 阳性者 301 例，占 25.99%，进一步进行 HBV-DNA 检测发现 301 例献血者中 HBV-DNA 阳性即 OBI 者 46 例，高达

15.28%，非 OBI 者 255 例，占 84.72%。本研究结果与上述有关研究结果存在一定的冲突，导致此种现象的原因可能是由于纳入样本量不同以及研究地区不同导致结果存在一定的差异，同时也提示我们对单采献血者仅采用常规检测方法可能存在 OBI 漏诊或误诊的风险，因此急需寻找灵敏度高的检测手段加以辅助，另探究 OBI 发生机制可能对减少 OBI 发生及增加其检出率具有重要意义。

研究发现，宿主年龄、性别及基因多态性可能影响其抵抗 HBV 感染的效果^[14]，IL-28b 基因编码的 λ 3 干扰素具有抗病毒及免疫调节等生物作用，IL-28b 基因变异，其中位于其启动子上游 8 kb 的 rs8099917 位点及基因上游 3 kb 的 rs12979860 位点与丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV）、HBV 对感染后自发清除及对干扰素治疗应答效果密切相关^[15-16]。LI 等^[17] 研究报道，IL-28b 基因变异与 HBV 病毒载量和肝脏炎症有关，IL-28b 基因 rs12979860 位点、rs12980275 位点及 rs8099917 变异可能通过降低病毒载量和肝脏炎症来阻止 HBV 进展。谈国蕾等^[18] 研究报道，江苏地区汉族人群 IL-28b 基因多态性与 HBV 感染后不同疾病表型相关，IL-28b 基因 rs12979860 位点 C 等位基因和 rs8099917 位点 T 等位基因可能是促进 HBV 感染后病情进展的影响因素。基于此，本研究推测 IL-28b 基因 rs12979860 位点及 rs8099917 位点多态性可能与 OBI 发生存在一定相关性。本研究结果发现，与非 OBI 比较，OBI 献血者 IL-28b 基因 rs8099917 位点 G 等位基因频率、TT+GG 基因型频率显著降低，T 等位基因频率、TT 基因型频率显著增加；rs12979860 位点 T 等位基因频率、CT+TT 基因型频率显著降低，C 等位基因频率、CC 基因型频率显著增加，且均与 OBI 献血者 HBV-DNA 载量有关，与谈国蕾等^[18] 研究基本相符，提示本研究推测正确，IL-28b 基因 rs12979860 位点及 rs8099917 位点多态性与 OBI 发生发展及 HBV 感染有关。

为进一步探究 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 发生的关系，本研究采用 Logistic 回归分析，结果发现，rs8099917 位点，与 TT 基因型比较，TG+GG 基因型可显著降低 OBI 发生风险；rs12979860 位点，与 CC 基因型比较，CT+TT 基因型可显著降低 OBI 发生风险，提示检测 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性可能对 OBI 发生评估及其检出率增加有一定辅助作用，可能对临床应用有一定参考价值。

综上所述，单采献血者中 OBI 可能与 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性有关，本研究可能对 OBI 治疗及检出提供了一个有价值

的基因工具。但关于 IL-28b 基因 rs8099917 位点、rs12979860 位点多态性与 OBI 发生发展的关系可能会受到不同地区种族遗传结构及样本量选择的影响，具体机制也尚不明确，可能导致结果存在一定偏倚，提示后期应扩大样本量，采取多中心全方面的研究，同时也提示在临床输血中应严格掌握用血适应症，提倡对患者实施自体输血，以减少感染发生。

参考文献：

- [1] 毕延伟, 杨小强, 孙平楠, 等. HBV 研究模型新进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(2):166-170.
BI Yanwei, YANG Xiaoqiang, SUN Pingnan, et al. New progress of HBV research model[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2019, 31(2):166-170.
- [2] MITSUMOTO-KASEIDA F, MURATA M, TAKAYAMA K, et al. Prevalence and characteristics of occult hepatitis B virus infection in Japanese human immunodeficiency virus-infected patients[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 26(1): 28-32.
- [3] WANG Hao, WANG Min, HUANG Jiying, et al. Novel hepatitis B virus surface antigen mutations associated with occult genotype B hepatitis B virus infection affect HBsAg detection[J]. Journal of Viral Hepatitis, 2020, 27(9): 915-921.
- [4] JAVANMARD D, NAMAIEI M H, FARAHMAND M, et al. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B virus infection among patients with hemophilia[J]. Journal of Medical Virology, 2019, 91(8): 1519-1527.
- [5] WANG Jiawen, ZHANG Panli, ZENG Jinfeng, et al. Occurrence of occult hepatitis B virus infection associated with envelope protein mutations according to anti-HBs carriage in blood donors[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2020, 92(1): 38-45.
- [6] TAKAHASHI T. Interleukin 28B genetic polymorphism and hepatitis B virus infection[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(34): 12026-12030.
- [7] ZHAO Jingyu, ZHANG Xinyue, FANG Lei, et al. Association between IL-28B polymorphisms and outcomes of hepatitis B virus infection: A meta-analysis[J]. BMC Medical Genetics, 2020, 21(1): 88.
- [8] 叶贤林, 李彤, 孙淑君, 等. 核心抗体阳性合格献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染分子生物学特性及追踪结果的研究[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(9): 890-894.
YE Xianlin, LI Tong, SUN Shujun, et al. Characterization and follow-up study of occult hepatitis B viral infection in anti-HBc positive qualified blood donors [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2016, 29(9): 890-894.
- [9] 刘丽华, 叶贤林, 程丽娜, 等. 广东省河源地区献血人群隐匿性乙型肝炎病毒感染的血清学及分子生物学特征分析[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4):32-36, 74.
LIU Lihua, YE Xianlin, CHENG Lina, et al. Analysis of serological and molecular characterization of occult hepatitis B virus infection among blood donors in Heyuan, Guangdong[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4):32-36, 74.

(下转第 37 页)