

丙型肝炎病毒感染与杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因的相关性

戴兵 徐罡 何吉 朱发明 胡伟

浙江省血液中心 浙江省血液安全重点实验室 浙江 杭州 310052

摘要: 目的 探讨浙江献血者中丙型肝炎病毒(HCV)感染与KIR基因的相关性。方法 选择2011年10月-2017年8月在浙江省血液中心的献血者经血液核酸筛查HCV RNA阳性的样本,以健康人群为对照样本。HCV RNA阳性样本和健康对照样本均用PCR-SSO的方法获得KIR基因频率,根据基因分布情况进行KIR基因型判断。用qPCR的方法分析KIR2DL1和KIR2DL3基因拷贝数差异。结果 HCV感染者KIR基因和基因型频率与健康对照者分布差异无统计学意义($P > 0.05$),而KIR2DL3拷贝数在健康对照者较HCV感染者显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 在浙江献血者中尚未发现HCV感染与KIR基因和基因型分布有相关性,而KIR2DL3基因在健康人群中可能通过基因数量对HCV的感染有一定的影响。

关键词: 丙型肝炎病毒; 杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因; 多态性

中图分类号: R512.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2020)15-1798-04

Association of KIR gene with hepatitis C virus infection

DAI Bing, XU Gang, HE Ji, ZHU Fa-ming, HU Wei

Blood Center of Zhejiang Province, Key Laboratory of Blood Safety Research of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310052, China

Abstract: Objective To find out the association of KIR genes with Hepatitis C Virus infection in Zhejiang blood donors. **Methods** Blood donors who donated blood from October 2011 to August 2017 were selected for HCV RNA-positive samples by nucleic acid amplification technology in Blood Center of Zhejiang Province. Healthy subjects were selected as population control. KIR gene frequency was obtained by PCR-SSO in both HCV RNA positive samples and control samples, and KIR genotype was determined according to gene distribution. The gene copy number differences of KIR2DL1 and KIR2DL3 were analyzed by qPCR. **Results** There were no significant differences in the distribution of KIR gene and genotype frequency between HCV-infected patients and the controls ($P > 0.05$), while the copy number of KIR2DL3 in the controls was significantly higher than that in HCV-infected patients, with the difference statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** HCV infection has not been found to be associated with KIR gene distribution in Zhejiang blood donors, and KIR2DL3 gene may have a certain effect on viral infection through gene number in healthy people.

Key Words: Hepatitis C virus; Killer cell immunoglobulin like receptor gene; Polymorphism

自然杀伤细胞(NK细胞)在机体先天性免疫功能中发挥重要作用,NK细胞通过细胞表面的活化性或抑制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)与靶细胞表面的HLA-I类分子结合,传导激活或抑制信号,从而调节NK细胞和T细胞的免疫杀伤活性^[1]。KIR属于免疫球蛋白超家族的一系列分子,基因定位于染色体19q13.4上,呈现单倍型和拷贝数多态性^[2,3]。KIR分子通过传导的信号影响NK和T细胞活性,在

肿瘤免疫、抗感染免疫、清除老化变异细胞、母胎耐受、造血干细胞移植和自身免疫疾病等领域发挥调节作用^[4-9]。本研究对丙型肝炎病毒(HCV)感染献血者与非感染献血者KIR基因多态性进行分析,并选取部分基因进行拷贝数差异检测,探索丙型肝炎病毒感染与杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象 献血者的选择按照《献血者健康检查标准》^[10,11]。选择2011年10月-2017年8月来浙江省血液中心献血的献血者,经血液核酸筛查HCV RNA阳性的样本。随机选取血清学检测阴性的健康献血者为对照组。

1.2 仪器与试剂 Forma class II A2 生物安全柜(美国

基金项目: 国家卫生和计划生育委员会科学研究基金(WKJ-ZJ-1815);浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYA070、2020KY109)

作者简介: 戴兵(1976-),女,硕士,主任技师,主要从事输血医学及实验研究工作。

通讯作者: 朱发明, E-mail: zfm00@hotmail.com

Thermo electron corporation); 全自动核酸抽提系统 MagNA Pure LC 2.0(美国罗氏公司); NanoDrop2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Luminex-200 型 ABI PCR 扩增仪(美国 Luminex 公司)。MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume(批号: 39343900); KIR SSO Genotyping Test(批号: 009); Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (批号: AI40715A)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 吸取血细胞样本 100 μl。使用 MagNA LC 2.0 全自动核酸分离纯化系统,应用配套 MagNA Pure LC DNA Isolation Kit - Large Volume 自动抽提试剂盒,严格按仪器使用说明书操作。抽提后的 DNA 经超微量分光光度计检测 DNA 浓度和纯度,纯度要求 ≥1.6,并用不含 RNA 酶的无菌水调整浓度至 15 ng/μl ~ 40 ng/μl。

1.3.2 KIR-SSO 方法检测 KIR 基因

1.3.2.1 KIR 基因片段的扩增 扩增引物为试剂盒内置引物,试剂按试剂盒要求。热循环条件:预变性: 96 °C 3 min,PCR 反应第一阶段 3 步,5 个循环: 96 °C 20 s,60 °C 20 s,72 °C 20 s,PCR 反应第二阶段 3 步,32 个循环: 96 °C,10 s,60 °C,15 s,72 °C,20 s,最后 72 °C,10 min。扩增后用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.3.2.2 样本杂交 杂交板每孔加 1.5 μl 变性缓冲液,加 3.0 μl DNA 扩增产物,吹打混匀,室温孵育 10 min 后,每孔加 3.0 μl 中和缓冲液,吹打混匀。每孔加 19 μl 的磁珠。将杂交板密封好后振荡混匀,PCR 仪 60 °C 孵育 15 min。从 PCR 仪上取下杂交板,每孔加 60 μl 的洗涤液。密封后,轻轻摇动混匀,3 700 r/min 离心 5 min。掉洗涤液,盖好封口膜,在振荡器上干震 10 s。重复洗涤 3 次后每孔加 24 μl 的 1 × SAPE 染液,密封后振荡混匀。PCR 仪 60 °C 孵育 5 min 后每孔立即加 60 μl 的洗涤液,密封后 3 700 r/min 离心 5 min。去掉洗涤液。盖好封口膜,在振荡器上干震 10 s。每孔加 55 μl 的 WB 吹打混匀后转移到读板上并在 Luminex 机器上机读取。

1.3.3 KIR2D 基因拷贝数的检测 STAT6 基因在所有人中均呈现 2 个拷贝,选取 STAT6 为参考基因^[2],用 qPCR 的 ΔCt 方法,对 KIR2DL1 和 2DL3 基因进行定量检测。KIR2DL1、KIR2DL3 与 STAT6 的引物和探针参照 Jiang 等^[12]的研究(表 1)。每样本进行 3 个平行试验,取三孔 Ct 值的均值,Ct 值代表超过检测阈值所需 qPCR 的循环数,因此 Ct 值大则基础拷贝数少。如果 Ct 值的 SD > 0.5 认为孔间差异较大,需进行重复试验。样本的 DNA 浓度经稀释均一化,且所有样本含有相同拷贝的 STAT6 基因,在同一体系内同时检测待检基因和参考基因,根据收集到的荧光信号,用 ΔCt 的方法比较 KIR2DL1 和 KIR2DL3 与 STAT6 基因间拷贝数的差异。

表 1 KIR2DL1、KIR2DL3 与 STAT6 的引物和探针序列

基因名称	引物和探针	序列(5'-3')
2DL1	正向引物	TTCTCCATCAGTCGCATGAC
	反向引物	GTCAGTGGGAGCTGACAC
	探针	AACAGAACCGTAGCATCTGTAGGTCCT
2DL3	正向引物	AGACCCTCAGGAGGTGA
	反向引物	CAGGAGACAACCTTTGGATCA
	探针	CCCTTCTCAGAGGCCAAGACACC
STAT6	正向引物	CCAGATGCCTACCATGGTGC
	反向引物	CCATCTGCACAGACCACTCC
	探针	CTGATTCTCCATGAGCATGCAGCTT

1.4 统计学处理 KIR 基因频率分析应用 HLA Fusion 3.0 Research(ONE LAMBDA) 分析软件。根据基因的分布情况,在 <http://www.allelrequencies.net> 网站进行 KIR 基因型判断。KIR 基因出现频率(F)通过计数测得;KIR 基因频率(gene frequency,P)计算公式: $P = 1 - \sqrt{1 - F}$; 基因型频率(genotype frequency) = 基因型阳性数 / 研究个体人数。KIR 基因频率的差异采用 Fisher's exact test 检验方法,基因间拷贝数的差异用 t 检验,应用 Graphpad Prism 5.0 软件分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV RNA 阳性献血者与对照组者 KIR 基因和基因型频率分析 收集到 HCV RNA 阳性献血者 105 例,对照组 265 例,经统计学分析献血者 HCV RNA 阳性及对照者 KIR 基因和基因型频率分布差异无统计学意义(P > 0.05)(表 2、表 3)。

表 2 HCV RNA 阳性献血者与对照者 KIR 基因频率分析

KIR 基因	HCV RNA 阳性者频率	对照者频率	P 值
2DL1	1.000	1.000	/
2DL2	0.095	0.142	0.106
2DL3	1.000	1.000	/
2DL4	1.000	1.000	/
2DL5	0.207	0.248	0.294
2DP1	1.000	1.000	/
2DS1	0.184	0.216	0.404
2DS2	0.085	0.129	0.125
2DS3	0.085	0.101	0.553
2DS4	0.831	0.747	0.210
2DS5	0.111	0.151	0.189
3DL1	0.831	0.762	0.421
3DL2	1.000	1.000	/
3DL3	1.000	1.000	/
3DP1	1.000	1.000	/
3DS1	0.166	0.218	0.151

注: /: 对照人群和 HCV RNA 阳性献血者基因频率相同,不比较 P 值。

表 3 HCV RNA 阳性献血者与对照者 KIR 基因型频率分析

单倍型组	基因型	HCV RNA 阳性者		对照者		P 值
		例数(例)	频率	例数(例)	频率	
AA	1	58	0.331 0	123	0.464 2	0.135
Bx	2	15	0.074 2	37	0.139 6	1.000
Bx	3	3	0.014 4	11	0.041 5	0.765
Bx	4	5	0.024 1	21	0.079 2	0.176
Bx	5	2	0.009 6	2	0.007 5	0.320
Bx	6	0	/	3	0.011 3	/
Bx	7	0	/	4	0.015 1	/
Bx	8	11	0.053 8	21	0.079 2	0.419
Bx	9	2	0.009 6	5	0.018 9	1.000
Bx	10	0	/	1	0.003 8	/
Bx	11	1	0.004 8	2	0.007 5	1.000
Bx	13	2	0.009 6	9	0.034 0	0.735
Bx	14	1	0.004 8	0	/	/
Bx	19	2	0.009 6	4	0.015 1	0.678
Bx	35	0	/	2	0.007 5	/
Bx	51	0	/	1	0.003 8	/
Bx	68	2	0.009 6	3	0.011 3	0.625
Bx	69	0	/	5	0.018 9	/
Bx	70	0	/	1	0.003 8	/
Bx	75	0	/	4	0.015 1	/
Bx	93	0	/	1	0.003 8	/
Bx	117	1	0.004 8	1	0.003 8	0.488
Bx	167	0	/	1	0.003 8	/
Bx	188	0	/	1	0.003 8	/
Bx	337	0	/	1	0.003 8	/
Bx	427	0	/	1	0.003 8	/

注: /: 对照人群较 HCV RNA 阳性献血者基因型多, HCV RNA 阳性献血者中部分基因型为 0, 无频率, 无对应 P 值。

2.2 *KIR2DL1* 和 *KIR2DL3* 基因拷贝数定量检测分析
 根据 *KIR* 基因频率分析, 选取者中普遍表达的 *KIR2DL1* 和 *KIR2DL3* 基因进行拷贝数定量检测, 在上述基因检测后又收集了 25 例阳性样本, 共收集了 HCV RNA 阳性献血者 130 例, 对照组者 100 例, 进行 qPCR 检测, 其中 *KIR2DL1* 基因检测中 1 例 HCV RNA 阳性样本、*KIR2DL3* 基因检测中 2 例 HCV RNA 阳性样本和 1 例对照样本因 SD 值偏大, 不计入结果。发现 *KIR2DL1* 基因的拷贝定量值在 2 组间差异无统计学意义 ($P = 0.564$), 而 *KIR2DL3* 基因的拷贝定量值在 2 组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

NK 细胞是先天性免疫的重要组成部分, 抗感染

免疫和抗肿瘤免疫中发挥重要的作用。NK 细胞的一部分功能通过 *KIR* 分子实现, *KIR* 分子种类和拷贝数都与 NK 细胞的功能相关^[13, 14]。*KIR* 家族呈现出高度多态性, *KIR* 的基因多态性和拷贝数多态性均与感染性疾病相关, 在病毒感染过程中发挥积极作用。Pelak 等^[15]研究表明, 拥有包括 *KIR3DS1* 基因在内的多个基因个体能更好地抵抗 1 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)。这种抵抗力与 *KIR3DS1* 分子的表达量高以及抑制 HIV-1 复制有关。其他一些学者的研究也表明 *KIR* 基因多态性和拷贝数多态性变异情况可能直接影响 NK 细胞库和 *KIR* 蛋白表达水平进而对 NK 细胞功能产生影响^[16]。

在 *KIR* 基因与 HCV 感染关系的研究中, 一些报道的研究数据显示 *KIR* 与其配体 HLA 的多态性分布与 HCV 感染有关^[17-21], 但是也有学者认为 *KIR* 等位基因和单倍型与中国汉族者慢性 HCV 感染没有相关性^[22]。本实验采用 PCR-SSO 的方法分析了献血者 HCV RNA 阳性及正常对照者的 *KIR* 基因, 尚未发现 *KIR* 基因和基因型频率差异有统计学意义。这可能是由于不同地区 HCV 的流行率及病毒的基因型不同, 导致 HCV 感染情况存在着地域上的差异; 而且 *KIR* 基因呈现高度遗传多态性, 不同种和地区 *KIR* 基因分布存在差异^[23, 24]。这些原因可能导致不同地区和人群的 *KIR* 基因和与 HCV 感染相关性的差异。

为进一步探索 *KIR* 基因对 HCV 感染的影响, 本实验室选择了频率均为 100% 的 *KIR2DL1* 和 *KIR2DL3* 基因, 采 qPCR 的方法进行拷贝数差异分析。*KIR2DL1* 基因拷贝数在 HCV 阳性者和健康对照者中没有显著性区别, 而 *KIR2DL3* 基因拷贝数在 HCV 阳性者和健康对照者中有显著性区别, 健康对照者的定量值较 HCV 阳性者显著性高。推测 *KIR2DL3* 在健康人群中可能通过基因数量调节蛋白的表达进而对病毒的感染有一定的影响。

参考文献

- [1] Schönberg K, Sribar M, Enczmann J, et al. Analyses of HLA-C-specific *KIR* repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition [J]. *Blood*, 2011, 117(1): 98-107.
- [2] Pontikos N, Smyth DJ, Schuilenburg H, et al. A hybrid qPCR/SNP array approach allows cost efficient assessment of *KIR* gene copy numbers in large samples [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 274.
- [3] Bruijnesteijn J, van der Wiel MKH, de Groot N, et al. Extensive alternative splicing of *KIR* transcripts [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2846.
- [4] Pende D, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-like receptors (*KIRs*): Their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1179.

(下转第 1811 页)

- [3] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, *et al.* Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364: 1523 - 1532
- [4] Jiao YJ, Zeng XY, Guo XL, *et al.* Preparation and evaluation of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for detection of total antibodies in human and animal sera by double - antigen sandwich enzyme - linked immunosorbent assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2): 372 - 377.
- [5] Gai ZT, Liang MF, Zhang Y, *et al.* Person - to - person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus through blood contact [J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(2): 249 - 252.
- [6] 黄学勇, 杜燕华, 李幸乐, 等. 新布尼亚病毒 IgG 抗体间接免疫荧光检测方法的建立 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(2): 165 - 168.
- [7] 吕惠荣, 杨云慧, 杜燕华, 等. 新布尼亚病毒核酸检测实时荧光 RT - PCR 方法的评价 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(5): 1186 - 1188.
- [8] 虞吉寅, 王忠发, 任宜, 等. TaqMan 探针实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应检测新布尼亚病毒 L 基因方法的建立与应用 [J]. *疾病检测*, 2013, 28(2): 132 - 135.
- [9] 宋玉亮, 叶继斌, 熊晨晖, 等. 一种新布尼亚病毒快速检测方法
- 的建立及应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(2): 180 - 182.
- [10] Glad C, Grubb AO. Immuno - capillary migration with enzyme - labeled antibodies: rapid quantification of creatinine protein in human plasma [J]. *Anal Biochemistry*, 1981, 116(2): 335 - 340.
- [11] Zhao YL, Zhang GP, Liu QT, *et al.* Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues [J]. *Agricultural Food Chem*, 2008, 56(24): 12138 - 12143.
- [12] 任冰强, 黄立华, 黄惠杰. 基于免疫层析技术的时间分辨荧光免疫分析仪研究 [J]. *仪器仪表学报*, 2009, 30(6): 1330 - 1335.
- [13] 宋克非, 张佩杰. 多功能灵敏固相时间分辨荧光免疫层析分析仪设计 [J]. *仪器仪表学报*, 2011, 32(11): 2609 - 2615.
- [14] 王丽, 刘靛雯, 冯兆雷, 等. 实时 RT - PCR 与 ELISA 在发热伴血小板减少综合征检测中的应用 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2015, 29(4): 351 - 353.
- [15] 杜燕华, 黄学勇, 王海峰, 等. 实时荧光 PCR 法与 ELISA 法在发热伴血小板减少综合征病例检测中的比较 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(1): 101 - 104.

收稿日期: 2019 - 05 - 09

(上接第 1800 页)

- [5] Babor F, Peters C, Manser AR, *et al.* Presence of centromeric but absence of telomeric group B KIR haplotypes in stem cell donors improve leukaemia control after HSCT for childhood ALL [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2019, 14: doi: 10.1038/s41409-019-0543-z.
- [6] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, *et al.* HLA and killer cell immunoglobulin - like receptor (KIRs) genotyping in patients with acute ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 88.
- [7] Sorgho PA, Martinson JJ, Djigma FW, *et al.* Insights into the interplay between KIR gene frequencies and chronic HBV infection in Burkina Faso [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2018, 10(1): e2018060.
- [8] Bi J, Tian Z. NK cell dysfunction and checkpoint immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1999.
- [9] Aghaei H, Mostafaei S, Aslani S, *et al.* Association study between KIR polymorphisms and rheumatoid arthritis disease: an updated - meta - analysis [J]. *BMC Med Genet*, 2019, 20(1): 24.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 18467-2001 献血者健康检查要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB 18467-2011 献血者健康检查要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [12] Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, *et al.* Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors [J]. *Genome Res*, 2012, 22(10): 1845 - 1854.
- [13] Pyke RM, Genolet R, Harari A, *et al.* Computational KIR copy number discovery reveals interaction between inhibitory receptor burden and survival [J]. *Pac Symp Biocomput*, 2019, 24: 148 - 159.
- [14] Alecsandru D, García - Velasco JA. Why natural killer cells are not enough: a further understanding of killer immunoglobulin - like receptor and human leukocyte antigen [J]. *Fertil Steril*, 2017, 107(6): 1273 - 1278.
- [15] Pelak K, Need AC, Fellay J, *et al.* Copy number variation of KIR genes influences HIV - 1 control [J]. *PLoS Biol*, 2011, 9(11): e1001208.
- [16] Beziat V, Traherne JA, Liu LL, *et al.* Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education [J]. *Blood*, 2013, 121(23): 4703 - 4707.
- [17] Thöns C, Senff T, Hydes TJ, *et al.* HLA - Bw4 80(T) and multiple HLA - Bw4 copies combined with KIR3DL1 associate with spontaneous clearance of HCV infection in people who inject drugs [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(3): 462 - 470.
- [18] Gardiner CM. NK cell function and receptor diversity in the context of HCV infection [J]. *Front Microbiol*, 2015, 30(6): 1061.
- [19] De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, *et al.* Genetic diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus - related diseases [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0117420.
- [20] Boelen L, Debebe B, Silveira M, *et al.* Inhibitory killer cell immunoglobulin - like receptors strengthen CD8⁺ T cell - mediated control of HIV - 1, HCV, and HTLV - 1 [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(29): pii: eaao2892.
- [21] Shan Z, Huang J, Liao Q, *et al.* Association of killer cell immunoglobulin - like receptors with spontaneous clearance of hepatitis C virus in the Chinese population [J]. *Transfusion*, 2018, 58(4): 1028 - 1035.
- [22] Li Q, Liu S, Zhang S, *et al.* Human leukocyte antigen but not KIR alleles and haplotypes associated with chronic HCV infection in a Chinese Han population [J]. *Int J Immunogenet*, 2019, 1: doi: 10.1111/iji.12425.
- [23] Amorim LM, van Tong H, Hoan NX, *et al.* KIR - HLA distribution in a Vietnamese population from Hanoi [J]. *Hum Immunol*, 2018, 79(2): 93 - 100.
- [24] Machado - Sulbaran AC, Muñoz - Valle JF, Ramírez - Dueñas MC, *et al.* Distribution of KIR genes and KIR2DS4 gene variants in two Mexican Mestizo populations [J]. *Hum Immunol*, 2017, 78(10): 614 - 620.

收稿日期: 2019 - 07 - 25