

慢性乙型肝炎患者 IL-1RN(T+8006C)位点基因多态性分析

万鸿君, 彭 芳(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-1 受体拮抗剂基因(IL-1RN)第 2 号外显子+8006T/C 位点基因多态性在慢性乙型肝炎患者中的分布及其相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性的分析方法, 对 450 例慢性乙型肝炎患者和 420 例对照者 IL-1RN(T+8006C)位点基因多态性进行检测, 计算并分析其等位基因和基因型频率。**结果** 观察组和对照组 IL-1RN(T+8006C)位点基因型的分布最常见为 TT 型, TC 型次之, CC 型则较为罕见; 在不同年龄组、不同性别间其分布比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 观察组 C 型等位基因及 TC 基因型频率明显低于正常对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** IL-1RN(T+8006C)位点等位基因及基因型的分布不存在年龄和性别间的区别, 但与慢性乙型肝炎存在相关性, 在乙型肝炎病毒感染中, C 型等位基因可能具有保护作用。

【关键词】 白细胞介素-1 受体拮抗剂; 基因; 多态性; 慢性乙型肝炎

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.10.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)10-1389-02

Analysis of gene polymorphism at the position IL-1RN(T+8006C) in patients with chronic hepatitis B WAN Hong-jun, PENG Fang (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective To investigate the distribution and correlation of gene polymorphism in the second exon of interleukin-1 receptor antagonist gene at position +8006[IL-1RN(T+8006C)] in patients with chronic hepatitis B. **Methods** The IL-1RN(T+8006C) polymorphism was detected by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms methods in 450 patients with chronic hepatitis B (observation group) and 420 healthy persons (control group), then the genotype and allele frequencies were calculated and analyzed. **Results** In the observation group and control group, the TT genotype was the most frequent, then the TC genotype, and CC genotype was rare. The distribution of genotypes and allele was no different among different gender and age groups ($P>0.05$). The frequencies of TC genotype and C allele were lower in patients with chronic hepatitis B than that of the control group ($P<0.01$). **Conclusion** The distribution of IL-1RN(T+8006C) genotypes and allele were no difference among different gender and age groups, but it has correlation with chronic hepatitis B. Allele C might be a protect factor against hepatitis B virus infection.

【Key words】 interleukin-1 receptor antagonist; gene; polymorphism; chronic hepatitis B

白细胞介素-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)基因(IL-1RN)2 号外显子存在一个+8006T/C 位点基因多态性, 由 T→C 转换所引起, 与 IL-1Ra 的表达相关, 而 IL-1Ra 可特异性地抑制 IL-1 引起的炎性反应, 是一种重要的内源抗炎因子, 因此, 该多态性可能与疾病的发生发展密切相关^[1-2], 但与慢性乙型肝炎是否相关目前尚不清楚。本文观察和分析了 IL-1RN(T+8006C)位点基因多态性在慢性乙型肝炎患者中的分布, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院门诊与住院部慢性乙型肝炎患者共 450 例为观察组, 其中男 250 例, 女 200 例, 年龄 18~82 岁, 平均年龄(43.1±13.5)岁, 所有病例均根据相关标准进行诊断^[3]。选择同期 420 例健康体检者为对照组, 其中男 230 例, 女 190 例, 年龄 18~83 岁, 平均年龄(44.6±14.2)岁。所有研究对象均为无血缘关系的汉族人群, 排除其他病毒性肝炎, 并排除内分泌、肝脏、肾脏和心脑血管疾病, 血常规及生化指标均在参考范围内。

1.2 仪器与试剂 主要仪器为美国 PE 公司 GeneAmp PCR System 2700 扩增仪, 法国 VL 自动凝胶成像及分析系统, PCR

试剂及 Alu 1 内切酶为 Promega 产品, 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

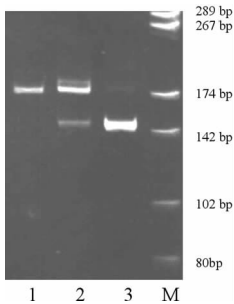
1.3 方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性的分析方法进行。根据相关文献[4]设计一对引物, P1: 5'-TTC TAT CTG AGG AAC AAC CAA CTA GTA GC-3', P2: 5'-AGG ATT AGG ACA TTG CAC CTA G-3', 扩增 IL-1RN 第 2 号外显子区(7 977~8 150)的片段。模板 DNA 的制备及 IL-1RN(T+8006C)位点基因多态性的检测与分析参照相关文献[5]进行。

1.4 统计学处理 研究对象 IL-1RN(T+8006C)位点等位基因及基因型频率用频率计数法计算, 并用 Hardy-Weinberg 定律进行遗传平衡分析。研究对象等位基因及基因型频率用 χ^2 检验进行比较, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-1RN(T+8006C)位点基因型检测结果 用限制性内切酶 Alu 1 酶切扩增产物, 经电泳后根据特异性电泳条带可检测出三种基因型: 即 TT 基因型有 1 条带(146 bp), TC 基因型有 2 条带(174 bp 和 146 bp), 而 CC 基因型有 1 条带(174 bp),

见图 1。



注:1 为 CC 基因型;2 为 TC 基因型;3 为 TT 基因型;M 为 pGEM3Zf(+)DNA/Hae 分子量标志物。

图 1 IL-1RN(+8006)位点基因型检测结果

2.2 不同性别间 IL-1RN(T+8006C)位点基因多态性分析

研究对象 IL-1RN(T+8006C)位点等位基因及基因型频率经

表 1 IL-1RN(T+8006C)位点多态性在不同性别间的比[n(%)]

组别	性别	n	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
			TT	TC	CC	T	C
观察组	男	250	227(90.8)	22(8.8) ^a	1(0.4)	476(95.2)	24(4.8) ^a
	女	200	183(91.5)	16(8.0) ^a	1(0.5)	382(95.5)	18(4.5) ^a
	合计	450	410(91.2)	38(8.4) ^a	2(0.4)	858(95.3)	42(4.7) ^a
对照组	男	230	190(82.6)	39(17.0)	1(0.4)	419(91.1)	41(8.9)
	女	190	158(83.2)	31(16.3)	1(0.5)	347(91.3)	33(8.7)
	合计	420	348(82.9)	70(16.6)	2(0.5)	766(91.2)	74(8.8)

注:与对照组比较,^aP<0.01。

表 2 IL-1RN(T+8006C)位点多态性在不同年龄组间的比较[n(%)]

组别	年龄(岁)	n	基因型频率			等位基因频率	
			TT	TC	CC	T	C
观察组	≤30	120	109(90.9)	10(8.3) ^a	1(0.8)	228(95.0)	12(5.0) ^a
	31~60	200	182(91.0)	17(8.5) ^a	1(0.5)	381(95.2)	19(4.8) ^a
	≥60	130	341(94.7)	11(8.4) ^a	0(0.0)	249(95.8)	11(4.2) ^a
对照组	≤30	110	91(82.7)	18(16.4)	1(0.9)	200(90.9)	20(9.1)
	31~60	190	157(82.7)	32(16.8)	1(0.5)	346(90.8)	34(8.9)
	≥60	120	100(83.3)	20(16.7)	0(0.0)	220(91.7)	20(8.3)

注:与对照组比较,^aP<0.01。

3 讨 论

IL-1 家族中唯一的内源性拮抗剂为 IL-1Ra,在疾病的发生发展过程中可能起着重要作用,其机理可能是与 IL-1 竞争结合 IL-1 受体而有效地拮抗 IL-1 所引起的炎症反应^[6]。IL-1RN(+8006T/C)位点基因多态性目前在 IL-1 家族中研究较少。有研究表明,IL-1RN 第 2 号内含子可变数串联重复多态性的等位基因Ⅱ(IL-1RN * Ⅱ)与 IL-1RN(+8006T/C)位点的等位基因 C 存在紧密连锁^[4],而前者与 IL-1Ra 的表达紧密相关^[7],因此,IL-1RN(+8006T/C)位点的等位基因 C 可能与疾病的发生发展密切相关,其机理是通过与 IL-1RN * Ⅱ的紧密连锁或直接调控 IL-1Ra 的表达。

慢性乙型肝炎是最主要的慢性病毒性疾病之一,在该病的病程中,遗传因素可能起着重要作用。近年来,乙型肝炎病毒易感性、治疗及预后等与细胞因子及其基因多态性已受到广泛关注^[8-11]。有研究发现,乙型肝炎病毒感染后果与肿瘤坏死因子基因多态性有关^[8]。然而,目前关于慢性乙型肝炎病程与 IL-1RN(T+8006C)位点基因多态性是否相关尚不清楚。

本研究发现,在慢性乙型肝炎患者和对照人群中,IL-1RN

χ^2 检验发现符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,表明具有群体代表性。研究人群中,IL-1RN(T+8006C)位点等位基因的分布以等位基因 T 为最常见,而等位基因 C 次之;IL-1RN(T+8006C)位点基因型以 TT 型最为多见,其次为 TC 型,CC 型较罕见。观察组 TC 基因型及 C 等位基因频率明显低于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=13.20, \chi^2=11.98, P<0.01$);观察组及对照组在本组不同性别间基因型和等位基因频率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.07, \chi^2=0.04; \chi^2=0.02, \chi^2=0.02; P>0.05$),见表 1。

2.3 不同年龄间 IL-1RN(T+8006C)位点多态性的分布 IL-1RN(T+8006C)位点等位基因及基因型分布在本组不同年龄组间比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.56, \chi^2=1.17, \chi^2=0.64, \chi^2=0.58; P>0.05$)。但观察组 TC 基因型及 C 等位基因频率明显低于对照组,差异有统计学意义($\chi^2=11.31, \chi^2=10.26, P<0.01$),见表 2。

(+8006T/C)位点可检测出 TT、TC 和 CC 三种基因型,其中等位基因 T 发生频率最高,而等位基因 C 发生频率较低。在不同性别和不同年龄组之间,IL-1RN(+8006T/C)位点基因型和等位基因型的分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$),表明该位点碱基突变不存在性别和年龄之间的区别。观察组 C 等位基因及 TC 基因型频率明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),表明慢性乙型肝炎病程与该位点基因多态性存在相关性。据此推测,携带等位基因 C 的个体体内 IL-1 的活性可能较不携带等位基因 C 者强,原因是其产生 IL-1Ra 的能力较低所致,而 IL-1 活性增强可进而导致 IL-1 β 的分泌增强,刺激机体产生肿瘤坏死因子、IL-2 和 IL-6,这些细胞因子可使中性粒细胞的吞噬作用得到进一步激活,促使机体清除感染病毒和其形成的免疫复合物。

总之,IL-1RN(+8006T/C)位点等位基因及基因型的分布不存在年龄、性别间的区别,但与慢性乙型肝炎密切相关,C 型等位基因可能在个体预防乙型肝炎病毒感染中具有保护作用,其确切机制尚待进一步研究。

(下转第 1392 页)

意义($P<0.01$)。

3 讨 论

MP 主要经飞沫传播,潜伏期 2~3 周,MP 型支原体肺炎起病缓,发病初期约 1/3 的患儿可无症状^[5]。目前,对 MP 的检测有支原体分离培养、聚合酶链反应、冷凝集试验及被动凝集法等^[6-7],因被动凝集法操作简单,无需特殊仪器设备,灵敏度高,特异性强,能在检测 3 h 后报告结果等优势,成为目前 MP 检测最主要的方法^[8]。

本研究应用被动凝集法检测 2 d 至 15 岁的患儿 4 783 例,MP-IgM 阳性率为 54.75%,表明万州区青少年 MP 感染率较高,MP 已成为本区儿童呼吸道感染的重要病原体。研究结果也显示,MP-IgM 阳性率女性患儿明显高于男性患儿,差异有统计学意义($P<0.01$),这与邝雪英和龙小山^[9]对从化地区的研究结果一致,但这种因性别引起的阳性率差异具体机制目前尚未清楚,还有待进一步研究。万州区青少年 MP 感染率随年龄增长明显升高,与梁小英和王莉宁^[10]的研究结果相一致,这可能与青少年随年龄增长,群体活动增多、活动范围变广,相互传播及接触 MP 的概率增大有关。1 岁以下儿童 MP-IgM 阳性率明显低于其他年龄段,可能由于 1 岁以下儿童完全由父母监管,照顾密度大,自主活动少、活动范围窄,故感染机会明显降低,这亦从侧面论证了孙菊娣等^[11]的报道。

MP 感染虽一年四季均可发病,但以秋冬季发病率较高^[12],本地区结果亦是这一特点。故秋冬季节,天气干燥寒冷之时,监护者应注意引导孩子多喝温水,进食易消化、营养丰富的食物;多开展户外活动,进行身体锻炼,尤其加强呼吸运动锻炼,以改善呼吸功能^[9];在气候骤变外出时,及时增添衣服或进行流感疫苗注射,以防受寒感冒。

参考文献

[1] Cimolai N, Cheong AC. An assessment of a new diagnostic indirect enzyme immunoassay for the detection of anti-Mycoplasma pneumoniae IgM [J]. Am J Clin Pathol,

1996, 105(2):205-209.

[2] Csabi G, Komaromy H, Hollody K. Transverse myelitis as a rare, serious complication of mycoplasma pneumoniae infection[J]. Ped Neurol, 2009, 41(4):312-313.

[3] 马莲美, 贾秀红, 王宝宏, 等. 肺炎支原体感染致过敏性紫癜 46 例临床分析[J]. 滨州医学院学报, 2007, 30(6):480.

[4] 黄海忠. 肺炎支原体感染患儿心肌酶学改变的临床意义分析[J]. 中国当代医药, 2011, 18(18):99-100.

[5] 周兰霞, 杜晓芸, 唐艳, 等. 兰州市 2 928 例血清肺炎支原体抗体检测分析[J]. 西部医学, 2012, 24(11):2163-2164.

[6] 胡元生, 温和等. 三种肺炎支原体检测方法的比较[J]. 临床输血与检验, 2008, 10(1):9-11.

[7] 石立新. 小儿肺炎支原体感染不同血清学方法检测及临床应用[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(23):3286-3287.

[8] Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, et al. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(6):708-710.

[9] 邝雪英, 龙小山. 从化市 1 844 例儿童呼吸道肺炎支原体感染抗体检测结果分析[J]. 中国社区医师, 2012, 14(10):276.

[10] 梁小英, 王莉宁. 小儿肺炎支原体抗体检测 2 563 例结果分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 10(16):1296.

[11] 孙菊娣, 蒋建胜, 寻湘琪. 2008 年溧阳地区小儿急性下呼吸道感染肺炎支原体的调查分析[J]. 当代医学, 2009, 15(18):157-158.

[12] 孔东辉, 李永利. 皖北地区 1 126 例上呼吸道感染患儿肺炎支原体 IgM 抗体结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(4):436-437.

(收稿日期:2014-09-25 修回日期:2015-01-02)

(上接第 1390 页)

参考文献

[1] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease [J]. Blood, 1996, 87(6):2095-2147.

[2] Barlo NP, van Moorsel CH, Korthagen NM, et al. Genetic variability in the IL1RN gene and the balance between interleukin (IL)-1 receptor agonist and IL-1 beta in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Clin Exp Immunol, 2011, 166(3):346-351.

[3] 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(2010 年版)[J]. 中西医结合肝病杂志, 2011, 21(2):121-122.

[4] Clay FE, Tarlow JK, Cork MJ, et al. Novel interleukin-1 receptor antagonist exon polymorphisms and their use in allele-specific mRNA assessment[J]. Human Genetics, 1996, 97(6):723-726.

[5] 徐朴, 李艳, 张平安. 湖北地区汉族人群 IL-1RN 第 2 号外显子 T+8006C 位点多态性分布的研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 27(1):3-4.

[6] Isoda K, Akita K, Isobe S, et al. Interleukin-1 receptor an-

tagonist originating from bone marrow-derived cells and non-bone marrow-derived cells helps to suppress arterial inflammation and reduce neointimal formation after injury[J]. J Atheroscler Thromb, 2014, 21(11):1208-1218.

[7] Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(10):2598-2602.

[8] 姜山, 谢青. 慢性病毒性肝炎与人类基因组相关性的研究进展[J]. 国外医学: 流行病学传染病学分册, 2002, 29(5):260-262.

[9] 胡春蓉, 陈春波, 谭晓菁, 等. IL-21 对慢性乙肝患者 HBeAb 生成与 B 淋巴细胞增殖的促进作用[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2):126-129.

[10] Tuncbilek S. Relationship between cytokine gene polymorphisms and chronic hepatitis B virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(20):6226-6235.

[11] 夏玉玲, 李辉, 闫川. 慢性乙型肝炎患者血清 IL-8 和 IL-23 检测的临床意义[J]. 中华全科医学, 2013, 11(2):295.

(收稿日期:2014-11-05 修回日期:2015-01-15)