

• 论 著 •

部分细胞因子基因多态性与自身免疫性肝炎的相关性研究

范列英, 朱 烨, 仲人前*, 屠小卿, 叶伟民, 曾万杰, 陆慧琦, 孔宪涛

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨 IL-1、IL-6、IL-10 基因多态性与中国人自身免疫性肝炎(AIH)发病的相关性。**方法:**采用限制性片段长度多态性分析法(RFLP-PCR)和序列特异性引物 PCR(SSP-PCR)分析 62 例 AIH 患者及 160 例健康对照外周血单核细胞基因组 DNA IL-1(+3953)、IL-1 受体拮抗剂(IL-1ra)、IL-6 启动子(-174)、IL-10 启动子(-592、-819、-1082)基因多态性, 并进行对比分析。**结果:**在所分析的基因多态性位点中,AIH 组的等位基因频率分布与正常对照组均无统计学差异。**结论:**IL-1B、IL-1RN 和 IL-6、IL-10 启动子基因多态性可能与中国人发生 AIH 的易感性无关。

[关键词] 肝炎, 自身免疫性; 白细胞介素 1; 白细胞介素 6; 白细胞介素 10; 基因多态性

[中图分类号] R 575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0253-879X(2004)12-1295-04

Correlation between interleukin gene polymorphisms and autoimmune hepatitis in Chinese population

FAN Lie-Ying, ZHU Ye, ZHONG Ren-Qian*, TU Xiao-Qing, YE Wei-Min, ZENG Wan-Jie, LU Hui-Qi, KONG Xian-Tao
(Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study IL-1(IL-1B and IL-1RN), 3 polymorphic sites in IL-10 gene promoter (positions -1082, -819, and -592), and 1 polymorphism in IL-6 promoter (positions -174) in patients with type 1 autoimmune hepatitis (AIH). **Methods:** Whole-blood samples were taken from 62 AIH patients and 160 healthy controls. DNA was extracted and the polymorphisms at positions IL-1 +3953, IL-1RN intron 2, IL-6 -174 and IL-10 -1082, -819 and -592 were determined using sequence-specific PCR (SSP-PCR) and restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP-PCR). **Results:** There were no significant differences in the distributions of the IL-1B, IL-1RN, IL-6 and IL-10 alleles, genotypes, or haplotypes between AIH patients and healthy controls. **Conclusion:** It is probable that the polymorphisms of IL-1 +3953, IL-1RN intron 2, IL-6 -174 and IL-10 -1082, -819 are not associated with autoimmune hepatitis in the Chinese population.

[KEY WORDS] hepatitis, autoimmune; interleukin-1; interleukin-6; interleukin-10; gene polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1295-1298]

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一组病因不明、伴有明显的自身免疫现象,以肝细胞炎症性坏死为主要病理改变的慢性肝脏疾病,主要累及中、老年妇女。人类 HLA 基因多态性分析显示 HLA-DRB1 * 0301, -DRB1 * 0401 是北欧高加索人 I 型 AIH 的易感基因,并与病情相关^[1,2],而日本、阿根廷、比利时及墨西哥 I 型 AIH 的易感基因位点则与高加索人不同(HLA-DRB1 * 0404, HLA-DRB1 * 0405)^[3,4]。此外,一些细胞因子基因多态性与 AIH 的相关性也因人种而异,如 TNF- α * 2 基因多态性与欧洲及北美 AIH 相关,但与南美人却不相关^[5,6]。为阐明中国人自身免疫性肝炎的易感基因,本研究选择具有促炎症或抑制炎症反应的细胞因子 IL-1、IL-6、IL-10,采用限制性片段长度多态性分析 PCR (restriction fragment length polymorphism analysis PCR, RFLP-PCR) 和序列特异性引物 PCR(sequence special PCR, SSP-PCR)方法分析其基因多态性与中国人 AIH 发生、发展的相关性,

并与正常献血员作比较。

1 材料和方法

1.1 研究对象 患者为 1998 年以来在我院住院或门诊就诊的 62 例 AIH 患者,均为居住于中国江浙、上海地区的汉族人。其中女性 44 例,年龄 16~79 岁,平均年龄(50.3 $\pm$ 10.7)岁;男性 18 例,年龄 21~62 岁,平均年龄(50.1 $\pm$ 9.7)岁。患者均满足以下几点:(1)血清中存在具有诊断意义的自身抗体,包括抗核抗体阳性(效价 $>1:100$)、抗平滑肌抗体、抗可溶性肝抗原抗体和抗肝肾微粒体抗体;(2)肝炎病毒感染指标均阴性,其中包括甲肝 IgM、乙肝的 HBsAg、HBeAg、HBeAb(采用美国雅培公司

[基金项目] 上海市卫生系统百人跨世纪优秀学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 范列英(1963-),女(汉族),博士,副教授,硕士生导师。

*Corresponding author. E-mail:rqzhong@guomai.sh.cn

AxSym 及原装配套试剂检测)、戊肝 IgM, IgG (新加坡 GeneLab 公司的 ELISA 试剂盒检测); (3) 均具有不同程度的肝功能生化指标异常; (4) 按照国际自身免疫肝病协会 (AASLD) 制定的 AIH 诊断标准^[7], 62 例 AIH 患者的积分均在 15 分以上 (表 1)。对照组为 160 例正常献血员。

表 1 62 例 AIH 患者的临床指标

Tab 1 Clinical features in patients with AIH

Clinical features	Female (n=44)	Male (n=18)
Duration of symptoms (t/month)	36.4 (6-134)	38.8 (18-72)
Concurrent immunologic diseases	5	2
ALP + AST < 1.5	44	11
1.5-3.0	5	2
Bilirubin (3.4-17.1 μmol/L)	62.4 (40.2-84.7)	63.5 (42.4-79.6)
Immunoglobulin G (7.6-16.6 g/L)	30.9 (12.1-34.1)	32.6 (18.3-33.4)
ANA ≥ 1 : 100	30	11
SMA ≥ 1 : 100	3	1
ANA and SMA ≥ 1 : 100	8	3
LKM-1 ≥ 1 : 100	1	1
SLA ≥ 1 : 100	2	2
Average alcohol intake	< 25 g/d	< 25 g/d
Other autoantibodies		
Atypical pANCA ≥ 1 : 32	13	4
PCA	7	4
TG or TM	4	0
AIH Score *	> 15	> 15

PCA: Parietal cell antibody; TG: Thyroglobulin autoantibody; TM: Thyromicrosomal autoantibody; AIH Score^[7]: Revised scoring system for diagnosis of AIH

1.2 IL-1、IL-6、IL-10 基因多态性分析 收集患者及正常对照外周抗凝血、分离单核细胞, 采用 Qia-gen 公司 DNA 纯化试剂盒纯化基因组 DNA。

1.2.1 IL-1 基因多态性分析 分析 IL-1B + 3953 位 G/A 多态性, 采用 PCR-RFLP 法, 限制性内切酶 *Taq* I 消化 PCR 产物, 如果 + 3953 位为 A (Allele 1), 将获得 114 bp 和 135 bp 两片段; 如果为 G (Allele 2) 则 PCR 产物不变。采用 SSP-PCR 方法分析 IL-1RN 基因多态性。IL-1RN 的基因多态性表现在内含子 2 区域内出现不同数量的 86 bp 片段重复序列。在人类有 5 种不同的重复组合等位基因, 等位基因 IL-1RN * 1、IL-1RN * 2、IL-1RN * 3、IL-1RN * 4、IL-1RN * 5 分别含有 4、2、5、3、6 个 86 bp 重复序列。由于在最后一个 86 bp 重复序列结束后的 20 个碱基处有一个 G/C 的多态性, 故 IL-1RN 3'-末端引物合成 2 条, 每个标本做 2 管 PCR。

1.2.2 IL-6 启动子 -174G/C 多态性分析 采用 SSP-PCR 方法分析, 特异性引物序列见表 2, 阳性

PCR 产物为 190 bp 的 DNA 片段。

1.2.3 IL-10 启动子基因多态性分析 采用 PCR-RFLP 技术检测 -592、-1082 位点基因多态性, 分别用限制性内切酶 *Afa* I 和 *Mnl* I 消化 PCR 产物。如 -592 位点为 A, 则 412 bp 的 PCR 产物被切成 176 和 236 bp 2 个片段, 如 -1082 位点为 G, 同样 139 bp 的 PCR 产物被消化成 106 bp 和 33 bp。采用 SSP-PCR 分析 -819 位点基因多态性, 阳性 PCR 产物为 402 bp (表 2)。具体步骤如下: 按照 GenBank 上报道的人类 IL-1B、IL-1RN、IL-6、IL-10 序列, 设计 PCR 引物, 进行 PCR。PCR 试剂盒购自 MBI Fermentas 公司。PCR 反应条件模板 DNA 30~50 ng, 引物 1 pmol/μl。DNA 模板 95℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 40 s, 退火温度见表 2, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环, 结束后 72℃ 延伸 5 min。如果是采用 PCR-RFLP 方法, 取 PCR 产物 10 μl 用相应的限制性内切酶消化后在含溴化乙锭的 2.0%~3.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR-SSP 方法则将 PCR 产物直接进行琼脂糖电泳鉴定。

表 2 分析 IL-1B、IL-1RN、IL-6、IL-10 基因多态性所用的引物

Tab 2 PCR primer pairs for genotyping in cytokines gene

Gene	Position	Primers	AT	Product size (bp)
IL-1B	+3953	5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' 5'-TTCAGTTCATATGCACCAGA-3'	50 C	249
IL-1RN	Inton 2	5'-GCCCTCAGCAACACTCTAT-3' 5'-CATCTTCCTGGTCTGCAGG-3' 5'-CATCTTCCTGGTCTGCAGC-3'	67 C *	*
IL-6	-174G/C	5'-CCCTAGTTGTGCTCTGCC-3' 5'-CCCTAGTTGTGCTCTGCC-3' 5'-GAGCTTCTCTTCGTTCC-3'	59.5 C 190 59.5 C 190	
IL-10	-1082G/A	5'-TCTTACCTATCCCTACTTCC-3' 5'-CTCGCTGCAACCAACTGGC-3' -819T/C 5'-AACTGAGGCACAGAGATG-3' 5'-AACTGAGGCACAGAGATA-3' 5'-AGCAACACTCCTCGCGCAAC-3'	58 C 63 C 63 C	139 402 402
	-592A/C	5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3' 5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3'	61.8 C 412	
HLA-DRB1	5C 3C	5'-TGCCAAGTGAGCACCCA A-3' 5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3'		796 * *

AT: Annealing temperature; *: Variable numbers of an 86 bp tandem repeat sequence; * *: The inter-reference of allele-specific PCR

1.3 统计学处理 采用 EpiCalc 2000 软件包分析, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

采用 PCR-RFLP 方法分析 IL-1B +3953 位基因多态性、采用 PCR 方法分析 IL-1RN 基因多态性,62 例 AIH 患者及正常献血员的分析结果见表 3。从表 3 中可看出,中国汉族人以 IL-1B * 1,1 型占绝大多数(96.9%),62 例 AIH 组为 98.4%,两者间无显著差异。统计学分析 IL-1RN 基因频率分布,显示 AIH 组 IL-1RN * 1、IL-1RN * 2 等位基因携带率与正常对照组相比无显著差异,且两组分析对象 IL-1RN * 3~* 5 型均未发现。SSP-PCR 方法分析 IL-6 -174G/C 基因多态性结果,160 例正常献血员和 62 例 AIH 患者全部为 GC 纯合子。IL-10 启动子区域有 3 个单核苷酸多态性被分析(-592 A/C, -819 T/C, -1082 G/A),尽管患者组每一等位基因频率与正常人的发生率有一定的差异,但经统计学分析结果无显著性差异。本研究结果显示正常对照组与文献报道^[8,9]的新加坡华人的 IL-1 +3953、IL-6 -174 和 IL-10 启动子区基因多态性分布极其相似,但与英国人、北爱尔兰人则明显不同。此外,中国汉族人、祖鲁人、墨西哥人 IL-6 -174 位的基因多态性分布相似。

表 3 AIH 患者组与正常对照组 IL-1B、IL-1RN、IL-6 和 IL-10 基因多态性分布
Tab 3 Genotype distributions of cytokines in AIH patients vs controls

Cytokines	Genotype	AIH[n(%)]	Control[n(%)]	P
IL-1B	1,1	61(98.4)	155(96.9)	0.53
	1,2	1(1.6)	4(2.5)	0.69
	2,2	0(0)	1(0.6)	0.53
IL-1RN	1,1	51(82.3)	127(79.4)	0.63
	1,2	10(16.1)	30(18.8)	0.64
	2,2	1(1.6)	3(1.9)	0.90
	others	0(0)	0(0)	
IL-6	GG	62(100)	160(100)	-
	GC	0(0)	0(0)	-
	CC	0(0)	0(0)	-
IL-10	-1082			
	AA	54(87.1)	144(90.0)	0.53
	GA	8(12.9)	16(10.0)	0.53
	GG	0(0)	0(0)	-
	-819			
	CC	7(11.3)	13(8.1)	0.46
	CT	27(43.6)	72(45.0)	0.84
	TT	28(45.2)	75(46.9)	0.81
	-592			
	CC	10(16.1)	16(10.0)	0.20
	CA	32(51.6)	83(51.9)	0.97
	AA	20(32.3)	61(38.1)	0.41

3 讨 论

IL-1 是一种很强的促炎症细胞因子,具有多种生物学功能,是参与慢性炎症、导致组织器官功能损害的主要炎症介质。IL-1 基因位于染色体 2q(2q13-14),编码 IL-1 α (IL-1A gene)、IL-1 β (IL-1B gene)和 IL-1 receptor antagonist (IL-1ra, IL-1RN gene)。IL-1ra 与 IL-1 α 、IL-1 β 竞争结合 I 型和 II 型 IL-1 受体,具有抑制炎症反应的作用。目前已发现 IL-1B 基因在转录起始点的上游(启动子区域,-511)和转录起始点下游(+3953 位点)存在多态性。体外研究显示 +3953 位点为等位基因 2(IL-1B * 2)时与 IL-1 β 分泌升高相关^[10]。IL-1RN 基因在内显子 2 处因 86 bp 片段重复数量不同而产生 5 种多态性,其中 2 种表型 IL-1RN * 1 和 IL-1RN * 2 常见。体外研究显示 IL-1RN * 2 与 IL-1ra 分泌升高有关,IL-1RN * 2 与 IL-1B * 1 间存在基因连锁,并均与 IL-1 β 合成降低有关^[11~13]。本研究分析结果显示 AIH 患者组与正常对照组的 IL-1B、IL-1RN 等位基因携带率分布均无显著差异。此结果与 Cookson 等^[5]报道的结果一致。

IL-10 主要由 Th2 细胞产生,具有抑制 Th1 细胞增殖、抑制 IL-2 等炎症细胞因子生成及促进 B 细胞生长的作用,因而 IL-10 在抑制细胞免疫反应、促进体液免疫反应中起重要作用。IL-10 基因启动子区域存在 3 个重要单核苷酸多态性(-1082 G/A, -819 T/C, -592 A/C),其中转录起始位点处(-1082) G/A 替换改变了机体合成 IL-10 的能力,-1082 G 与 IL-10 高产量相关,而 -1082 A 则与低产量相关。在正常人群,上述 3 个突变位点的某些等位基因间(GCC、ACC 和 ATA)存在着明显的连锁不平衡,其中 GCC 等位基因可能与 IL-10 合成增加有关^[14]。在 Cookson 等^[5]的研究中还分析了北欧高加索人 AIH 中 IL-10 启动子区上述 3 个基因多态性等位基因频率分布,结果仍然与本研究一致,即与正常对照组无显著差异。此外,AIH 患者血清中 IL-10 的含量与正常对照也无显著差异^[15]。IL-6 具有促进多种细胞增殖、分化的作用,也是一种促炎症细胞因子。有研究显示在 IL-6 基因启动子-174 位点存在 G/C 基因多态性,IL-6 -174G 等位基因与 IL-6 合成增加相关^[16]。已有研究证实 IL-6 -174G/C 多态性与多种慢性疾病相关,包括青少年型关节

炎、冠心病和糖尿病等^[5,17]。此外,在器官移植研究中发现供者携带 IL-6 -174 CC 纯合子、而受者携带 IL-6 -174 GG 纯合子均与急性、慢性移植排斥反应的发生及其严重程度明显相关^[18]。进一步说明 IL-6 基因通过 G/C 多态性变化改变体内 IL-6 的分泌量,进而导致具有不同遗传背景的个体发生移植排斥反应、自身免疫性病等的易感性不同。但是在本研究中,160 例正常人和 62 例 AIH 患者全部为 -174 GG 纯合子,说明 IL-6 -174 C 等位基因在中国汉族人群中极少见,IL-6 -174 多态性与中国人 AIH 的易感性无关。

本研究基因多态性分析结果发现 IL-1 +3953、IL-1RN、IL-6 -174 和 IL-10 启动子区基因多态性与中国汉族人 AIH 无明显相关。这说明虽然上述基因多态性位点可以影响体内细胞因子的表达量,但可能不是中国汉族人 AIH 的易感基因。

[参考文献]

- [1] Strettell MDJ, Donaldson PT, Thomson LJ, et al. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(11):2028-2035.
- [2] Czaja AJ, Strettell MDJ, Thomson LJ, et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Hepatology*, 1997, 25(2):317-323.
- [3] Pando M, Larriba J, Fernandez GC, et al. Pediatric and adult forms of type 1 autoimmune hepatitis in Argentina: Evidence for differential genetic predisposition [J]. *Hepatology*, 1999, 30(5):1374-1380.
- [4] Kawa S, Ota M, Yoshizawa K, et al. HLA DRB10405-DQB10401 haplotype is associated with autoimmune pancreatitis in the Japanese population [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(5):1264-1269.
- [5] Cookson S, Constantini PK, Clare M, et al. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Hepatology*, 1999, 30(3):851-856.
- [6] Bittencourt LP, Palacios SA, Cancado ELR, et al. Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor polymorphisms at position -318 [J]. *J Hepatol*, 2001, 35(1):24-28.
- [7] Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: Review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis [J]. *J Hepatol*, 1999, 31(5):929-938.
- [8] Brull DJ, Lesson CPM, Montgomery HE, et al. The effect of the interleukin-6 -174G>C promoter gene polymorphism on endothelial function in healthy volunteers [J]. *Euro J Clin Invest*, 2002, 32(2):153-157.
- [9] Meenagh A, Williams F, Ross OA, et al. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America [J]. *Human Immunology*, 2002, 63(11):1055-1061.
- [10] Fociet F, Molvig J, Wogensen L, et al. A Taq1 polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion *in vitro* [J]. *Eur J Clin Invest*, 1992, 22(6):396-402.
- [11] Danis VA, Millington M, Hyland VJ, et al. Cytokine production by normal human macrophages: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene polymorphism [J]. *Clin Exp Immunol*, 1995, 99(2):303-310.
- [12] Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN * 2) is associated with enhanced IL-1b production *in vitro* [J]. *Scand J Immunol*, 1998, 47(3):195-198.
- [13] Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1B genes [J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(8):2598-2602.
- [14] Crawley E, Kay R, Silliborne J, et al. Polymorphic haplotypes of the IL-10 5' flanking region determine variable IL-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(11):1011-1018.
- [15] Czaja AJ, Sievers C, Zein NN. Nature and behavior of serum cytokines in type 1 autoimmune hepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2000, 45(5):1028-1035.
- [16] Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, et al. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility [J]. *Gut*, 2001, 48(3):397-402.
- [17] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(7):1369-1376.
- [18] Cavet J, Dickinson AM, Norden J, et al. Interferon-γ and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation [J]. *Blood*, 2001, 98(5):1594-1600.

[收稿日期] 2004-07-21

[修回日期] 2004-11-15

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群