

· 论 著 ·

IL-12B 基因多态性与肝硬化易感性的关联研究*

赵巍峰¹, 谷高玲², 杜敬佩¹, 李长安¹, 窦 芊¹, 孙长宇^{3△}(1. 新乡医学院第三附属医院感染科, 河南新乡 453003; 2. 新乡医学院第三附属医院
心内科, 河南新乡 453003; 3. 郑州大学第一附属医院感染科, 郑州 450052)

摘要:目的 探讨白细胞介素 12B(IL-12B)基因多态性与肝硬化易感性的关联。方法 收集肝硬化患者 173 例作为研究组,其生物学父母作为对照组。运用聚合酶链反应扩增及单核苷酸多态性的分子生物学技术,检测 IL-12B 基因 rs15677380、rs14050311 基因多态性,进行肝硬化与 IL-12B 基因多态性的关联分析和单体型相对风险率分析。结果 IL-12B 基因单核苷酸多态性(SNP)位点 rs15677380 与肝硬化相关联($P=0.009$),其中等位基因 A 为危险因素($Z=2.36$),G 是保护因素($Z=-2.36$); rs14050311 等位基因多态性与肝硬化相关联($P=0.013$),其中等位基因 C 是保护因素($Z=-2.24$),T 为危险因素($Z=2.24$)。rs15677380、rs14050311 单型型的 G/T、A/C 与肝硬化有关联($P=0.021, 0.015, Z=-1.85, 2.16$)。结论 IL-12B 基因多态性与肝硬化的发生存在关联。

关键词:肝硬化;白细胞介素 12B;多态性;关联分析

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)24-2825-02

Association study of cirrhosis and IL-12B gene polymorphism*

Zhao Weifeng¹, Gu Gaoling², Du Jingpei¹, Li Chang'an¹, Dou Qian¹, Sun Changyu^{3△}

(1. Department of Infection, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China;
2. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang Henan 453003, China;
3. Department of Infection, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To detect the genetic association between cirrhosis and polymorphism of IL-12B gene. Methods Observed in a sample of 173 parent/offspring trios where the proband net for cirrhosis using correlation analysis and haplotype relative risk analysis. The polymorphism of rs15677380, rs14050311 of IL-12B gene was detected with PCR methods and SNP typing in all nucleus families. Results The rs15677380 allele was connected with cirrhosis($P=0.009$). Allele G was protect factor($Z=-2.36$) and allele A was the hazard factor($Z=2.36$). The rs14050311 allele was connected with cirrhosis($P=0.013$). Allele T was protect factor($Z=-2.24$) and allele C was the hazard factor($Z=2.24$). The haplotypes of G/T and A/C in the rs15677380, rs14050311 were associated with cirrhosis($P=0.021, 0.015, Z=-1.85, 2.16$). Conclusion It shows an association between cirrhosis and the polymorphism of IL-12B gene in Chinese.

Key words: cirrhosis; IL-12B; polymorphism; association analysis

肝硬化的发生、发展与个体的免疫因素有直接关系,相同的生活环境中不同的人对于乙型肝炎病毒侵袭的反应差异与个体的基因多态性有关^[1]。采用家系资料研究可以避免因不同人群环境和暴露因素差异引起的系统误差^[2]。白细胞介素 12B(IL-12B)基因调控活化的巨噬细胞和 B 细胞分泌 IL-12 的一条重肽链 p40 的产生^[3],在肝硬化基因学研究中白细胞介素基因逐渐受到关注。为了解 IL-12B 基因与肝硬化是否存在关联,本文采用肝硬化核心家系资料进行研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 2009 年 10 月至 2012 年 10 月在本院传染科门诊或住院治疗的肝硬化患者作为研究对象。研究对象入组标准:(1)父母及本人均为汉族人群,年龄大于或等于 18 岁;(2)符合乙型肝炎病毒感染的诊断标准^[4],具有明显肝硬化临床体征;(3)B 超提示有肝硬化特征表现;(4)本人及其生物学父母知情同意。对照组为患者生物学父母。研究对象排除标准:(1)6 个月内曾患严重心、肝、肾及脑器质性疾病;(2)患有精神病、高血压或糖尿病等遗传性疾病。研究组 173 例,其中,男 82 例,女 91 例;年龄 18~47 岁,平均(27.41±8.54)岁;发病年龄 16~36 岁,平均(22.41±9.43)岁;病程 0.5~14.4

年,平均(1.48±0.83)年。对照组共 346 例,其中,男 173 例,女 173 例;平均年龄(58.1±14.7)岁。

1.2 方法

1.2.1 血样收集 对所有研究对象抽取空腹肘静脉血 10 mL,采用 0.5 mol/L 的 EDTA(pH 8.0)100 μL 抗凝,-20 ℃ 冰箱冻存备用。

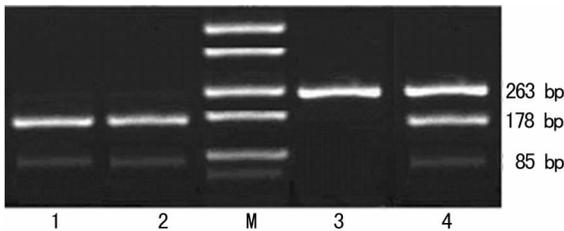
1.2.2 提取基因组 DNA 及其分型 采用 Chelex100 快速萃取法提取血样中的总 DNA,用 0.8% 琼脂糖电泳检测提取的结果。采用 Primer Premier 5.0 对 IL-12B 基因启动子区的 2 个单核苷酸多态性(SNP)位点 rs15677380 和 rs14050311 设计引物并进行聚合酶链反应(PCR)扩增。rs15677380 上游引物为:5'-ACT CTA GCT GAT GTT CAG CTG GAG C-3',下游引物为:5'-TTC GGG GGC CTT TGT CAA AAT CAC C-3'; rs14050311 上游引物为:5'-CTA AGT TTT TAG AAT TTG TTT ATT T-3',下游引物为:5'-CAC AAT ACT GTA AAG TAA TTA TCC T-3'。总反应体系 25 μL,其中包括 DNA 模板 4 μL,上下游引物各 2 μL,2×Tap PCR MasterMix 12 μL,余为双蒸水。预处理为温度 95 ℃,时间 5 min;循环反应中热变性温度 95 ℃,时间 30 s;延伸温度为 72 ℃,时间为 30 s;退

火温度分别为 60℃、61℃,时间 30 s。共 35 个循环。最后延伸 10 min。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。对 PCR 扩增产物采用限制性酶切,rs15677380 为 DdeI,rs14050311 为 SphI,酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。根据酶切图谱判断基因型。

1.3 统计学处理 等位基因单体型相对风险率分析和关联性分析采用 FBAT1.7.3 进行分析处理。对各组基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡定律的吻合度检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

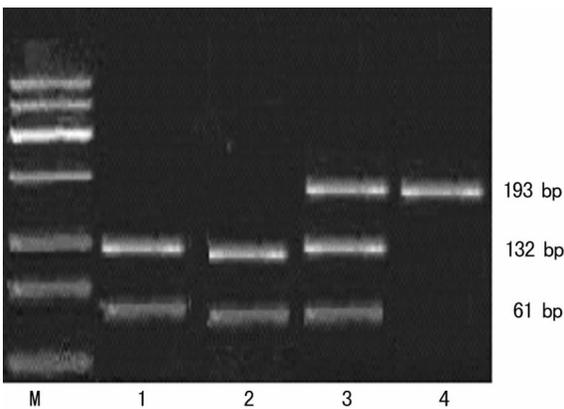
2 结果

2.1 IL-2B 等位基因酶切结果 检测结果表明 IL-2B 基因 SNP 位点 rs15677380 为 A/G 2 种基因型,PCR 长度为 263 bp,酶切长度分别为 85 bp 和 178 bp,其中 A/A 纯合切开,A/G 杂合切开,G/G 纯合未切开。IL-2B 基因 SNP 位点 rs14050311 为 C/T 2 种基因型,PCR 长度为 193 bp,酶切长度分别为 61 bp 和 132 bp,其中 C/C 纯合切开,C/T 杂合切开,T/T 纯合未切开(图 1~2)。



M:marker;1,2:A/A;3:G/G;4:A/G。

图 1 rs15677380 酶切结果



M:marker;1,2:C/C;3:C/T;4:T/T。

图 2 rs14050311 酶切结果

2.2 Hardy-Weinberg 平衡的吻合度检验 研究组与对照组 IL-2B 基因 SNP 位点 rs15677380 和 rs14050311 基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验结果表明吻合度良好, $P > 0.05$ 。见表 1。

表 1 对照组和研究组基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验

| SNP 位点 | 组别 | χ^2 | ν | P |
|------------|-----|----------|-------|---------|
| rs15677380 | 研究组 | 0.83 | 2 | >0.05 |
| | 对照组 | 0.92 | 2 | >0.05 |
| rs14050311 | 研究组 | 0.71 | 2 | >0.05 |
| | 对照组 | 0.66 | 2 | >0.05 |

2.3 IL-2B 基因 SNP 位点的等位基因关联性分析 IL-2B 基因 SNP 位点 rs15677380 与肝硬化相关联($P = 0.009$),其中

等位基因 A 为危险因素($Z = 2.36$),G 是保护因素($Z = -2.36$);rs14050311 等位基因多态性与肝硬化相关联($P = 0.013$),其中等位基因 C 是保护因素($Z = -2.24$),T 为危险因素($Z = 2.24$)。见表 2。

表 2 IL-2B 基因各位点等位基因频率的相关分析

| SNP 位点 | 等位基因 | 频率 | 家系数 | Z | P |
|------------|------|-------|-----|-------|-------|
| rs15677380 | A | 0.318 | 131 | 2.36 | 0.009 |
| | G | 0.682 | 131 | -2.36 | 0.009 |
| rs14050311 | C | 0.354 | 109 | -2.24 | 0.013 |
| | T | 0.646 | 109 | 2.24 | 0.013 |

2.4 IL-2B 基因 SNP 位点的等位基因单体型相对风险率分析 rs15677380、rs14050311 单体型的 G/T、A/C 与肝硬化有关联($P = 0.021, 0.015, Z = -1.85, 2.16$)。G/C、A/T 单体型与肝硬化无关联($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 IL-2B 基因各位点单体型相对风险率分析

| rs15677380 | rs14050311 | 基因频率 | 家系数 | Z | P |
|------------|------------|-------|------|-------|-------|
| G | C | 0.167 | 61.8 | -0.34 | 0.412 |
| A | T | 0.198 | 65.6 | 0.57 | 0.327 |
| G | T | 0.379 | 89.3 | -1.85 | 0.021 |
| A | C | 0.106 | 37.8 | 2.16 | 0.015 |

3 讨论

肝硬化发生与周围环境因素和个体遗传因素有关,影响机体抵抗力的遗传基因研究受到越来越多学者的关注^[5]。IL-2B 基因位于染色体 5q31~33,调控活化的巨噬细胞和 B 细胞分泌 IL-12 的一条重肽链 p40 的产生。IL-12 属于炎症因子之一,可以协助机体对乙型肝炎病毒的清除。IL-2B 基因表达可以提高机体免疫力,抗乙型肝炎病毒的作用机理主要包括:(1)通过 NKT 细胞、CD4⁺ T 细胞和 NK 细胞等效应细胞起细胞毒作用^[6];(2)通过肿瘤坏死因子介导的间接清除乙型肝炎病毒作用^[7];(3)IL-12 作用于 NK 细胞,产生内源性 IFN- γ ,在抗乙型肝炎病毒中起关键作用;表达产物可以通过直接调理先天免疫介导的吞噬细胞功能或活化补体系统起间接调理作用,属于天然抗感染免疫分子^[8]。IL-2B 基因 SNP 位点多态性会影响血清 IL-2B 结构和浓度,使机体对乙型肝炎病毒感染的抵抗力下降。

Hirschfield 等^[9]对 2 072 例加拿大和美国人肝硬化病例的 IL-2B 基因多态性进行了系统研究,结果表明 IL-2B 基因与肝硬化有显著关联($OR = 1.51, P < 0.05$)。Guan 等^[10]通过动物实验发现 IL-2B 基因表达质粒能够增强疫苗所诱导的小鼠免疫应答。Suneetha 等^[11]对 253 例丙型肝炎感染患者和 380 例正常对照的基因组研究中发现,IL-12 基因多态性与重度肝硬化关系密切($P = 0.004$)。本研究发现 IL-2B 基因 SNP 位点 rs15677380、rs14050311 等位基因与肝硬化相关联,rs15677380、rs14050311 单体型的 A/A、G/G 与肝硬化有关联,与国外学者的研究结论一致。

Marcos 等^[12]对 258 例肝病患者(其中 97 例为肝硬化)和 101 例正常人群的 IL-2B 基因多态性进行比较,结果发现 IL-2B 基因多态性与肝硬化无相关性。不同研究结果的差异较大,考虑与研究样本数、种族和研究方法差异有关。

总之,IL-2B 基因通过调控活化的巨噬细胞和 B 细胞分泌 IL-12,参与机体抵抗病毒的侵袭,与肝硬化(下转第 2831)

本研究对于络活喜联合苯那普利是否能调节血脂也进行了探索,发现治疗前、后观察组和对照组患者血总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇以及低密度脂蛋白胆固醇水平比较差异无统计学意义。但本研究样本量较小,可能不能真实反映络活喜联合苯那普利对于患者血脂的改善作用,故尚需临床大样本量多中心研究进一步考证。

综上所述,络活喜联合苯那普利的治疗方案可以有效控制中老年高血压合并 NIDDM 患者的血压和血糖,并改善患者的胰岛素抵抗,效果优于单一运用络活喜,值得在临床实践中加以推广应用。

参考文献:

- [1] 袁春花. 依伦平与络活喜治疗高血压的疗效比较[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(12): 1064-1065.
- [2] Ferrier C, Ferrari P, Weidmann P, et al. Anti-hypertensive therapy with Ca²⁺ antagonist verapamil and/or ACE inhibitor enalapril in NIDDM patients[J]. Diabetes Care, 1991, 14(10): 911-914.
- [3] 李莹, 周冷淇, 杜屏, 等. 氨氯地平及达爽对高血压患者血压昼夜变化规律的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2010, 29(4): 457-460.
- [4] 谢卫民. 苯那普利联合氨氯地平治疗老年高血压的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(27): 44-44.
- [5] 李莉秋, 刘培良, 袁龙, 等. 非胰岛素依赖型糖尿病并高血压的动态血压初步分析[J]. 中国实用医药, 2009, 4(8):

110-111.

- [6] 景林德, 刘玉清, 刘红, 等. 氨氯地平降压疗效与 L 型钙离子通道 α_1C 亚基的基因多态性的关系[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(1): 8-12.
- [7] 郭新胜. 非胰岛素依赖型糖尿病合并高血压对心脑血管疾病的影响[J]. 中国实用医药, 2010, 5(33): 178-179.
- [8] 戴思平. 苯那普利联合硝苯地平治疗糖尿病合并高血压 48 例疗效观察[J]. 吉林医学, 2010, 31(7): 960-961.
- [9] 谢萍, 曹云山, 苏鹏, 等. 急性冠状动脉综合征患者炎症因子的变化及苯那普利的干预作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(11): 1152-1154.
- [10] 吴泽兵, 张颖, 余其贵, 等. 缬沙坦联合氨氯地平或氢氯噻嗪对老年高血压患者血压变异性的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(1): 8-13.
- [11] 陈源源, 马志毅, 孙宁玲, 等. 左旋氨氯地平对血压控制不良患者微量白蛋白尿逆转作用的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(7): 675-678.
- [12] Ivankovic M, Radman M, Gverovic-Antunica A, et al. Influence of hypertension and type 2 diabetes mellitus on cerebrovascular reactivity in diabetics with retinopathy[J]. Ann Saudi Med, 2013, 33(2): 130-133.
- [13] 杨文娟. 对非胰岛素依赖型糖尿病患者动态血压监测的临床研究[J]. 护理实践与研究, 2010, 7(13): 15-16.

(收稿日期: 2013-03-25 修回日期: 2013-05-22)

(上接第 2826 页)

的发生、发展关系密切。目前,相关性研究还较少,尚需更多的大样本实验研究来证实。

参考文献:

- [1] 汪茂荣. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗的发展趋势[J]. 国外医学:医学地理分册, 2012, 33(1): 1-4, 8.
- [2] 张丽, 陈元堂, 余冰, 等. 5-羟色胺转运体基因 rs9863857 与抑郁症及其临床特征的相关性研究[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2009, 18(5): 401-403.
- [3] Chen XJ, Han SP, Wang SM, et al. Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in chinese women[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(1): 400-405.
- [4] 王林川, 于燕, 徐莉. 乙型肝炎病毒核酸抗原相关的检测及临床意义[J]. 国外医学:医学地理分册, 2011, 32(4): 261-263, 273.
- [5] Tsuda M, Zhang W, Yang GX, et al. Deletion of IL-12p35 induces liver fibrosis in dominant negative transforming growth factor β receptor type II mice[J]. Hepatology, 2012, 57(2): 806-816.
- [6] Li Y, Zhang C, Wu Y, et al. Interleukin-12p35 deletion promotes CD4 T-cell-dependent macrophage differentiation and enhances angiotensin II-induced cardiac fibrosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(7): 1662-1674.
- [7] Ben Chaaben A, Busson M, Douik H, et al. Association of

IL-12p40+1188 A/C polymorphism with nasopharyngeal cancer risk and tumor extension[J]. Tissue Antigens, 2011, 78(2): 148-151.

- [8] Pan Y, Wang Y, Cai L, et al. Inhibition of high glucose-induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats[J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(3): 1169-1182.
- [9] Hirschfield GM, Liu X, Xu C, et al. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants[J]. N Engl J Med, 2009, 360(24): 2544-2555.
- [10] Guan Q, Ma Y, Hillman CL, et al. Targeting IL-12/IL-23 by employing a p40 peptide-based vaccine ameliorates TNBS-induced acute and chronic murine colitis[J]. Mol Med, 2011, 17(7/8): 646-656.
- [11] Suneetha PV, Goyal A, Hissar SS, et al. Studies on TAQ1 polymorphism in the 3' untranslated region of IL-12p40 gene in HCV patients infected predominantly with genotype 3[J]. J Med Virol, 2006, 78(8): 1055-1060.
- [12] Marcos M, Pastor I, González-Sarmiento R, et al. Common polymorphisms in interleukin genes(IL-4, IL-6, IL-8 and IL-12) are not associated with alcoholic liver disease or alcoholism in Spanish men[J]. Cytokine, 2009, 45(3): 158-161.

(收稿日期: 2013-03-14 修回日期: 2013-05-20)