

IL-18 基因启动子多态性分布与儿童脓毒症的关系

陈丙文, 陈斌斌, 石泽真

广东省深圳市宝安区中心医院儿科, 广东 深圳 518102

摘要: **目的** 研究广东地区汉族儿童脓毒症患儿与健康儿童白细胞介素(IL)-18 基因启动子多态性分布规律,并探讨其与儿童脓毒症之间的关系。**方法** 选择广东地区汉族 65 例脓毒症患儿(脓毒症组)及 82 名健康儿童(对照组)作为研究对象。两组儿童均检测血清 IL-18 水平,并运用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)方法对 IL-18 基因启动子区的-607C/A、-137G/C 多态位点进行检测,比较两组 IL-18 基因启动子多态性分布规律,并探讨其与儿童脓毒症之间的关系。**结果** 脓毒症组患儿血清 IL-18 水平显著高于对照组儿童 [(199.37 ± 22.65) pg/ml vs (67.38 ± 11.29) pg/ml, $P < 0.01$]。脓毒症组与对照组-607C/A、-137G/C 多态性位点的等位基因频率及基因型频率差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。**结论** 广东地区汉族儿童 IL-18 基因启动子多态性可能与脓毒症的易感性无明显相关性。

关键词: 脓毒症; 白细胞介素 18; 白细胞介素-18 基因启动子; 单核苷酸多态性; 基因型频率; 等位基因频率
中图分类号: R 631 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)01-0036-04

Relationship between IL-18 gene promoter polymorphism distribution and child sepsis

CHEN Bing-wen, CHEN Bin-bin, SHI Ze-zhen

Department of Pediatrics, Baoan District Center Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong 518102, China

Abstract: Objective To study the regularities of interleukin (IL)-18 gene promoter polymorphism distribution in pediatric sepsis patients and healthy children of Han nationality in Guangdong area and its association with child sepsis. **Methods**

Sixty-five pediatric sepsis patients (sepsis group) and 82 healthy children (control group) of Han nationality in Guangdong area were selected as research objects. The level of serum IL-18 was detected in all participants. The sequence-specific primers polymerase chain reaction (PCR-SSP) method was used to detect the polymorphic sites-607C/A and-137G/C in IL-18 gene promoter loci. The polymorphism distribution regularity of IL-18 gene promoter in two groups was compared and its association with children sepsis was explored. **Results** The level of serum IL-18 in sepsis group was significantly higher than that in control group [(199.37 ± 22.65) pg/ml vs. (67.38 ± 11.29) pg/ml, $P < 0.01$]. There were no significant differences in allele frequency and genotype frequency of-607C/A and-137G/C polymorphic sites (all $P > 0.05$) in two groups. **Conclusion** The IL-18 gene promoter polymorphism of Han children in Guangdong area might be no obvious correlation with susceptibility of sepsis.

Key words: Sepsis; Interleukin-18; Interleukin-18 gene promoter; Single nucleotide polymorphism; Genotype frequency; Allele frequency

研究证实,当出现脓毒症时,机体会释放出大量的细胞因子,其水平在炎症反应不同个体中存在一定的差异性,部分个体中此种差异甚至非常大^[1-2]。因此,基因尤其是细胞因子相关的基因可能与脓毒症的发生存在一定的关联性。脓毒症患儿血清白细胞介素(IL)-18 水平显著上升^[3]。IL-18 又称为“IFN- γ 诱导因子”,参与多种自身免疫性疾病及变态反应性疾病的发生、发展^[4]。编码 IL-18 的基因主要位于人类

第 11 号染色体(11q22.2 ~ q22.3)上,主要由 6 个外显子与 5 个内含子所组成。其外显子 2 上游启动因子区域序列存在单核苷酸多态性(SNP),且与 IL-18 水平存在非常紧密的相关性^[5]。本文研究了广东地区汉族儿童脓毒症患儿与健康儿童 IL-18 基因启动子多态性分布规律,并探讨其与儿童脓毒症之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 根据国际脓毒症及脓毒性休克指南中关于儿童脓毒症的临床诊断标准,选择 65 例脓毒

症患者作为研究对象,其中男 39 例,女 26 例;年龄 9 个月~11 岁(4.30 ± 0.12)岁;APACHE II 评分 11~26(18.38 ± 2.22)分。另外选择同期于我院接受检查的 82 名广东籍健康儿童作为健康对照组,其中男 48 例,女 34 例;年龄 11 个月~12 岁(4.46 ± 0.14)岁。两组儿童在性别、年龄方面的差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

1.2 入选及排除标准 入选标准^[6]:(1)具有感染征象;(2)存在全身炎症反应综合征(SIRS);(3)感染并伴随器官血流灌注不充分或者功能障碍等。排除标准^[7]:(1)不符合上述入选标准者;(2)心脏停搏者;(3)急诊手术者;(4)不愿接受中心静脉置管者。

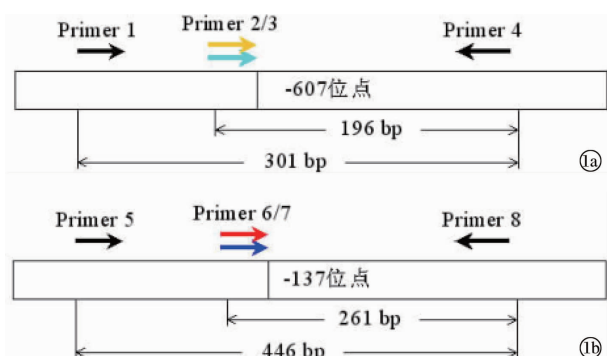
1.3 试剂 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0、TaKaRa Ex Taq™、DNA Fragment Purification Kit,三种试剂均购自于宝生物功能(大连)有限公司。

1.4 仪器 贝克曼低温离心机(USA)、PCR 扩增仪(MyCycler Thermal Cycler, USA)、DYY-III-8B 稳压稳流型电泳仪(北京六一仪器厂生产)、紫外凝胶分析系统(SynGene 公司生产)。

1.5 引物 根据 Giedraitis V 等针对-607 及-137 位点合成两组引物,采用序列特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)法扩增 IL-18 基因启动子区的两段序列。引物序列如表 1 所示^[8],PCR-SSP 扩增图见图 1。

表 1 IL-18 基因启动子区-607 及-137 位点引物序列

位点	引物序列
-607	
Primer 1	5'-CTT TGC TAT CAT TCC AGG AA-3'
Primer 2	5'-GTT GCA GAA AGT GTA AAA ATT ATT AC-3'
Primer 3	5'-GTT GCA GAA AGT GTA AAA ATT ATT AA-3'
Primer 4	5'-TAA CCT CAT TCA GGA CTT CC-3'
-137	
Primer 5	5'-CCA ATA GGA CTG ATT ATT CCG CA-3'
Primer 6	5'-CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AG-3'
Primer 7	5'-CCC CAA CTT TTA CGG AAG AAA AC-3'
Primer 8	5'-AGG AGG GCA AAA TGC ACT GG-3'



注:1a:-607 位点;1b:-137 位点。

图 1 IL-18 基因启动子区位点序列特异性引物 PCR 扩增示意图

1.6 试验方法 (1)基因启动子区序列扩增方法:根据 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 的实际操作规范,提取外周血基因组 DNA。PCR 反应体系:模板 DNA 体积为 2.0 μ l;10 \times Ex Taq Buffer 体积为 2.0 μ l;2.5 mmol/L 的 dNTP Mixture 体积为 2.0 μ l;25 mmol/L 的 MgCl₂ 体积为 1.5 μ l;-607 位点:Primer 1~7 的体积分别为 0.3 μ l、0.8 μ l、0.8 μ l、0.8 μ l、0.6 μ l、1.0 μ l、1.0 μ l,浓度均为 10 μ mol/L;dd H₂O 补足至 20.0 μ l。PCR 反应条件为:-607 位点:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 0.5 min,64 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,循环数分别为 7 个、25 个及 27 个。(2)PCR 产物分析:PCR 扩增产物使用浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶,于 1 \times TAE 缓冲液之中,以 3~5 V/cm 的电压进行电泳试验,此阶段持续时间为 0.5 h;运用 EB 染色,最后在紫外灯照射下进行观察并运用紫外凝胶分析系统进行成像分析。(3)PCR 产物纯化片段测序:使用 DNA Fragment Purification Kit 对 PCR 产物进行纯化,以将 PCR 反应中的残留物(如酶蛋白、引物及 dNTP 等)加以去除。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,对脓毒症患儿组与健康儿童组的两个 SNP 等位基因出现的频率进行 Hardy-Weinberg 平衡分析;对两个 SNP 等位基因频率以及基因型分布与脓毒症患儿的相关性分析采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症患儿组与健康对照组血清 IL-18 水平比较 脓毒症患儿组血清 IL-18 水平为(199.37 ± 22.65) pg/ml,显著高于健康对照组的(67.38 ± 11.29) pg/ml($t = 10.293, P = 0.000$)。

2.2 IL-18 基因启动子序列-607C/A 及-137G/C 位点的扩增电泳结果 采用 PCR-SSP 方法对脓毒症患儿组与健康对照组儿童 IL-18 基因启动子区的两段序列进行扩增,引物、扩增产物与基因型之间的相关关系见表 2,电泳结果见图 2。

2.3 IL-18 基因启动子区-607C/A、-137G/C 位点扩增产物测序结果分析 根据测序结果证实,IL-18 基因启动子区-607 位点存在三种基因型,即:CC、CA 及 AA 型;-137 位点也存在三种基因型,即:GG 型、GC 型及 CC 型。

2.4 脓毒症患儿组与健康对照组 IL-18 基因启动子多态性分析 脓毒症患儿组与健康对照组 IL-18-607C/A、-137G/C 位点的等位基因分布无统计学差异(P 均 > 0.05),且符合 Hardy-Weinberg 平衡具有群

表 2 -607C/A 及-137G/C 位点不同引物组合、扩增产物与基因型的关系

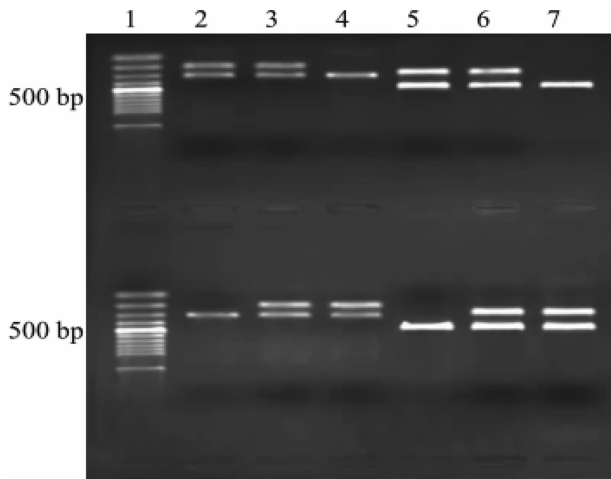
基因型	-607 位点扩增产物/bp		-137 位点扩增产物/bp	
	Primer 1/2/4	Primer 1/3/4	Primer 5/6/8	Primer 5/7/8
CC 型	301(+),196(+)	301(+),196(-)	-	-
CA 型	301(+),196(+)	301(+),196(-)	-	-
AA 型	301(+),196(-)	301(+),196(+)	-	-
GG 型	-	-	446(+),261(+)	446(+),261(-)
GC 型	-	-	446(+),261(+)	446(+),261(+)
CC 型	-	-	446(+),261(-)	446(+),261(+)

表 3 脓毒症患儿组与健康对照组 IL-18 基因启动子多态性比较 例(%)

类型	健康对照组(n=82)	脓毒症患儿组(n=65)	χ^2 值	P 值
基因型频率				
-607 位点				
CC	17(20.73)	13(20.00)	1.392	0.078
CA	57(69.51)	52(80.00)		
AA	8(9.76)	0		
-137 位点				
GG	61(74.39)	44(67.69)	1.292	0.098
GC	20(24.39)	13(20.00)		
CC	1(1.22)	8(13.31)		
等位基因频率				
-607 位点				
C	88(53.66)	78(60.00)	0.726	0.309
A	76(46.34)	52(40.00)		
-137 位点				
G	146(89.02)	119(91.54)	0.289	0.556
C	18(10.98)	11(8.46)		

表 4 不同地区人群间 IL-18 基因启动子多态性分布情况比较 (%)

地区	例数	-607 位点基因型频率			-607 位点等位基因频率		-137 位点基因型频率			-607 位点等位基因频率	
		CC	CA	AA	C	A	GG	GC	CC	G	C
意大利	130	33	49	18	58	42	55	41	5	76	24
瑞典	139	37	48	14	62	38	54	41	5	75	25
日本	130	44	39	17	63	37	75	23	2	87	13
捷克	139	31	53	16	58	42	49	44	7	71	29
中国	65	20	80	0	60	40	68	20	12	92	8
χ^2 值		44.392			1.327		49.390			19.387	
P 值		<0.01			>0.05		<0.01			<0.01	



注:2~4:-607 CC 型、CA 型、AA 型;5~7:-137 GG 型、GC 型、CC 型。

图 2 IL-18 基因启动子-137、-607 位点多态性电泳图谱

体代表性;统计结果显示,脓毒症患儿组与健康对照

组-607C/A 与-137G/C 多态性位点的等位基因频率以及基因型频率之间的差异也均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.5 不同地区人群间(意大利、瑞典、日本、捷克、中国)IL-18 基因启动子多态性分布情况 对比-607 位点不同人群间基因型频率间差异存在显著性($P < 0.01$),不同人群间等位基因频率间的差异均无统计学意义($P > 0.05$);-137 位点不同人群之间的基因型频率及等位基因频率间的差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 4。

3 讨论

IL-18 又称为“IFN- γ 诱导因子”,主要由活化的巨噬细胞以及 Kupffer 细胞产生的一种前炎性细胞因子^[9-10]。其主要生物学活性是诱导 Th1 细胞而产生

IFN- γ ; 诱导 T 细胞产生 GM-CSF; 促使 T 细胞增殖以及使得 NK 细胞活性显著增强; 促使 FAS 配体的高表达, 增强了 FAS 介导的细胞毒性作用等多种生物学活性, 具有肿瘤抑制以及增强免疫等方面的作用, 且参与到多种自身免疫性疾病以及变态性疾病的发生、发展过程中^[11]。据相关文献报道, 脓毒症的发生机制中, IL-18 扮演着非常重要的角色^[12]。脓毒症患儿外周血单个核细胞 (PBMC) 能够自发地分泌出高浓度 IL-18, 而且患者血清中 IL-18 水平与疾病的活动度存在显著的相关性, 均提示其可能与疾病的发生、发展存在一定的相关性。对脓毒症患儿 IL-18 基因启动子 2 个已知突变位点的多态性, 经与健康儿童对比, 能够很好地探讨 IL-18 与脓毒症遗传易感的相关关系。

本研究运用 PCR-SSP 扩增的方法结合测序对 65 例脓毒症患儿与广东地区汉族的 82 名健康儿童中 IL-18 基因启动子-607 及-137 两个多态性位点的分布情况进行了检测分析。结果显示: 脓毒症患儿组与健康儿童组-607C/A、-136G/C 多态性位点的基因型频率间的差异均无统计学意义。然而, 本研究显示, 在 65 例脓毒症患儿中均未检测到-607 位点的 AA 基因型, 而在健康对照组中该基因型的频率则为 9.76%。对此, 此位点的 SNP 是否与脓毒症及其 IL-18 的高表达水平有一定关系尚需更深层次的研究。Xu 等在 IL-18 基因启动子区域的 SNP 与风湿性关节炎相关性的研究中, 提出-607 AA 基因型是防止 RA 进展的一个保护性因素, 我们与这些研究结果相当一致。笔者还将意大利、瑞典、日本、捷克和中国广东地区人群 IL-18 基因启动子-607、-137 两个位点多态性研究结果比较分析, 结果表明: -607 位点不同人群间基因型频率间差异存在显著性, 不同人群间等位基因频率间的差异均无统计学意义; -137 位点不同人群之间的基因型频率及等位基因频率间的差异均具有统计学意义。从我们研究结果可以发现, IL-18 基因启动子的等位基因频率及基因型分布在不同地区、不同种族人群间存在着明显的差异, 这些研究成果为今后研究各个地区各种族人群基因多态性与疾病的相关性提供了分子遗传学数据, 为从基因水平进一步

研究某些疾病的发病机理作好前期的基础工作。

综上所述, 广东地区汉族儿童 IL-18 基因启动因子多态性可能与脓毒症的易感性无明显相关性。

参考文献

- [1] 姚晨玲, 刘成龙, 宋振举, 等. 白介素-1 受体相关蛋白酶-4 基因多态性与脓毒症的易感性[J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21(2): 128-132.
- [2] 陈子盛, 傅应云. 白细胞介素-15 在脓毒症免疫细胞应答中的作用[J]. 广东医学, 2011, 32(19): 2605-2607.
- [3] 陈德, 杨敬平, 银雪, 等. 脓症患者血清中 TLR-4、TREM-1、sCD14 和 IL-18 的变化[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(11): 1956-1959.
- [4] 蔡露良, 向伟, 谢耀琦, 等. 脓毒症儿童白细胞介素 18 基因启动子多态性研究[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(1): 9-14.
- [5] Das K, Ozdogan M, Karateke F, et al. Comparison of APACHEII, P-POSSUM and SAPS II scoring systems in patients underwent planned laparotomies due to secondary peritonitis[J]. Ann Ital Chir, 2014, 85(1): 16-21.
- [6] 徐朴, 余华. 武汉地区汉族健康人群白细胞介素-1 家族基因型分布情况调查[J]. 公共卫生与预防医学, 2011, 22(5): 44-48.
- [7] Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(9): 1237-1247.
- [8] Molloy EJ. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) family and the application of its antagonists[J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2009, 4(1): 51-56.
- [9] Bauer M, Press AT, Trauner M. The liver in sepsis: patterns of response and injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2013, 19(2): 123-127.
- [10] 杨孟选, 冯凯, 张红星, 等. 白细胞介素 6 基因多态性与河南地区汉族人群脓毒症的关系[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(1): 71-72.
- [11] Boskabadi H, Maamouri G, Tavakol Afshari J, et al. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality[J]. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(12): 1232-1237.
- [12] Garbers C, Thaiss W, Jones GW, et al. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor[J]. J Biol Chem, 2011, 286(50): 42959-42970.

收稿日期: 2015-10-08 编辑: 周永彬