

白细胞介素-1 家族细胞因子等位基因 对相关细胞因子的产生及全身感染预后的影响

杨明施 马朋林 陈德昌

【摘要】 目的 探讨白细胞介素-1(IL-1)家族细胞因子基因多态性中等位基因对细胞因子 mRNA 表达、蛋白质合成以及全身感染预后的影响。**方法** 选择全身感染患者及健康志愿者各 60 例。分离健康志愿者外周血单核细胞,体外培养并予以脂多糖(LPS)刺激,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分析细胞因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra mRNA 表达,酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞因子浓度。盐析法提取所有受试者基因组 DNA,行 IL-1A(内含子 6, VNTR), IL-1B(-511, RFLP)及 IL-1RN(内含子 2, VNTR)基因多态性分析。**结果** 与健康志愿者比较,全身感染患者中等位基因 IL-1RN2 携带者显著增多,而 IL-1A2、IL-1B2 及 IL-1RN2 携带者病死率增加。体外研究表明,等位基因 IL-1RN2 较 IL-1RN1 携带者外周血单核细胞在受 LPS 刺激时细胞因子 IL-1ra 分泌及 mRNA 表达显著增加,而 IL-1A、IL-1B 各等位基因不影响相应细胞因子表达。**结论** 遗传因素可能是导致全身感染患者发生不同程度炎症反应的重要原因。等位基因 IL-1RN2 通过上调细胞因子 IL-1ra 表达,影响全身感染患者预后,可能是全身感染的高危遗传学标志。

【关键词】 全身感染; 白细胞介素-1; 等位基因; 细胞因子

Association of different alleles in interleukin - 1 family genes with the coded cytokines production and outcome of sepsis YANG Ming - shi * , MA Peng - lin, CHEN De - chang. * Affiliated the Third Hospital of Xiangya Medical College, Zhongnan University, Changsha 410013, Hunan, China
Corresponding author: MA Peng - lin(Email: plma1019@yahoo.com)

【Abstract】 Objective To investigate the association of alleles in interleukin - 1(IL - 1) family genes with IL - 1 α , IL - 1 β , IL - 1ra production as well as mRNA expression and the outcome of sepsis. **Methods** Sixty septic patients and equal number of healthy volunteers were enrolled in this study. Monocytes of healthy volunteers segregated by Ficoll were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) in vitro. IL - 1 α , IL - 1 β and IL - 1ra mRNA expressions were semi - quantitatively analyzed with reverse transcription - polymerase chain reaction(RT - PCR). Cytokine production was determined with enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA). Alleles in IL - 1A (intron 6, VNTR), IL - 1B (-511, RLFP) and IL - 1RN (intron 2, VNTR) were screened in all cases. **Results** The number of individuals carrying allele of IL - 1RN2 was significantly greater in septic patients than that in healthy volunteers. Mortality in septic patients with IL - 1RN2, compared with IL - 1RN1, was markedly higher. Notably, IL - 1ra production as well as mRNA expression of monocytes challenged with LPS was significantly higher in IL - 1RN2 allele than in IL - 1RN1 carriers. However, there was no difference in the coded gene expression between alleles of IL - 1A1 and IL - 1A2, also between IL - 1B1 and IL - 1B2. **Conclusion** IL - 1RN2 allele induces high IL - 1ra expression and is closely with the outcome of patients in sepsis. It could be one of high risk genetic factors in septic patients.

【Key words】 sepsis; interleukin - 1; allele; cytokines

近年来,细胞因子基因多态性与全身感染关系的研究受到了广泛的重视。现有研究发现,在全身感染病理生理学过程中起关键作用的细胞因子,如肿

瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-10 以及 IL-1 家族(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra)等均存在基因多态性^[1]。Stuber 等^[2]的研究表明, TNF B2 在全身感染患者中发生频率增加,其携带者病死率升高。我们亦曾研究发现,IL-1 家族中某些等位基因与全身感染疾病严重程度及预后关系密切^[3]。然而,有关细胞因子基因多态性影响全身感染预后的作用机制目前尚不清楚。本研究拟探讨 IL-1 家族细胞因子基因中 IL-1A 第六内含子 46 bp 同向重复结构可变数多态性(VNTR), IL-1B 启动子-511 位点限制性片段长度多态性(RFLP),以及 IL-1RN 第二内含子 86 bp VNTR 中不同等位基因

基金项目:北京市科技计划重大资助项目(H020920020530)

作者单位:410013 长沙,中南大学附属湘雅三医院(杨明施); 100091 北京,解放军总医院第三〇九临床部 ICU(马朋林);北京协和医院(陈德昌)

通讯作者:马朋林(1962-),男(汉族),湖南省岳阳市人,留美博士,中国病理生理学会危重病专业委员会全国委员,全军急救医学专业委员会危重病学组委员,中南大学湘雅第三医院客座教授(Email: plma1019@yahoo.com)

作者简介:杨明施(1961-),女(汉族),湖南省长沙市人,副主任医师(Email: yangms1961@163.com)。

对外周血单核细胞 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra mRNA 表达及蛋白质合成的影响。

1 资料与方法

1.1 按照 1991 年美国芝加哥会议制定全身感染 (sepsis) 诊断标准, 选择汉族全身感染患者 60 例以及健康志愿者 (正常对照组) 60 例。全身感染组中男 38 例, 女 22 例; 平均年龄 (58.3 \pm 15.4) 岁。正常对照组中男 35 例, 女 25 例; 平均年龄 (24.5 \pm 6.1) 岁。

1.2 外周血单核细胞分离与培养

1.2.1 取正常对照组的健康志愿者外周血 30 ml, 肝素抗凝, 3 000 r/min 离心分离血浆。采用 Ficoll 分离单个核细胞及白细胞 (取白细胞层行基因多态性分析)。取单个核细胞层贴壁培养分离单核细胞, 用 RPMI 1640 完全培养液 (含体积分数为 10% 的小牛血清) 调节细胞浓度至 5×10^5 , 接种 6 孔板, 每孔 2 ml (双孔对照), 体积分数为 5% 的 CO₂, 37 °C 培养 24 h 后向其中 2 孔加入脂多糖 (LPS) 1 μ g/ml, 另 2 孔为空白对照。继续培养 4 h 后收集细胞, 取培养上清 1 ml, -20 °C 保存, 备测细胞因子浓度。

1.2.2 取所有受试者外周血 5 ml, 离心后提取血清 1 ml, -20 °C 保存, 备测细胞因子浓度。

1.3 细胞因子 mRNA 半定量分析: 用 SV 总 RNA 隔离系统 (Promega 公司提供) 从培养细胞中提取总 RNA。用一步法逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测细胞因子表达 (试剂盒由 Promega 公司提供)。引物序列见表 1。RT-PCR 反应条件为 37 °C 下 3 h 反转录成 cDNA; 随后以下列条件 PCR 体外扩增: 94 °C、5 min, 95 °C、1 min, -55 °C、1 min, -72 °C、1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。取 PCR 产物 10 μ l, 用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳。摄片后进行吸光度 (A 值) 扫描分析, 以目的条带与阳性内参照条带密度比值作为 mRNA 半定量表达结果。

1.4 细胞因子浓度的检测: 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定培养上清及血浆中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra 浓度。试剂盒由 Immunotech 公司提供, 严格按照试剂盒操作说明进行实验。

1.5 基因多态性分析: 采用盐析法从外周血白细胞中提取基因组 DNA, PCR 扩增目的片段, 引物序列见表 1。IL-1 各 PCR 反应条件如下。

1.5.1 IL-1A (内含子 6, VNTR): 98 °C、2 min 预变性, 96 °C、1 min, 58 °C、1 min, 74 °C、6 min, 共 35 个循环; 74 °C 延伸 8 min。

1.5.2 IL-1B (-511, RFLP): 95 °C 3 min 预变性, 95 °C、1 min, 55 °C、1 min, 74 °C、1 min, 共 35 个循

表 1 细胞因子 mRNA、RT-PCR 及多态性分析引物 (Sington 合成)

Table 1 Primer sequence for RT-PCR and polymorphism screening

RT-PCR 引物	引物序列
mRNA 引物 IL-1 α (420 bp)	1:5'-GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC-3' 2:5'-CATGTCAAATTTCACTGCTTC ATCC-3'
IL-1 β (430 bp)	1:5'-GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC-3' 2:5'-CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC-3'
IL-1ra(521 bp)	1:5'-GGCCTCCGAGTCACCTAATCACTCT-3' 2:5'-TACTACTCGTCTCTGGAAGTAGAA-3'
RT-PCR 内参照 (280 bp)	引物由试剂盒生产商提供, 序列未知
多态性分析引物 IL-1A (内含子 6, VNTR)	1:5'-GCC TCT AGA CTC ATA GAA CTT AGTC-3' 2:5'-GTG AGG TCA GGC CAT TGC ACTG-3'
IL-1B (-511, RFLP)	1:5'-TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC-3' 2:5'-GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT-3'
IL-1RN (内含子 2, VNTR)	1:5'-CTC AGC AAC ACT CCT AT-3' 2:5'-TCC TGG TCT GCA GGT AA-3'

环; 74 °C 延伸 6 min。取反应产物 20 μ l 加入限制性内切酶 Ava 16 U, 37 °C 水浴 3 h。

1.5.3 IL-1RN (内含子 2, VNTR): 96 °C、1 min 预变性, 94 °C、1 min, 55 °C、1 min, 72 °C、1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

1.5.4 各取 10 μ l 终反应产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离目的条带。

1.6 统计学处理: 数据分析采用 SPSS 软件, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 基因多态性分析及其与全身感染预后的关系 (表 2, 表 3): 在 IL-1A、IL-1RN 等位基因中, IL-1A3、IL-1A4 及 IL-1RN3、IL-1RN4 发生频率极低, 因此, 本次未对上述等位基因进行研究。与健康志愿者比较, 全身感染患者中携带等位基因 IL-1A1、IL-1A2、IL-1B1 及 IL-1B2 例数并无显著变化; 但等位基因 IL-1RN2 携带者病例数显著高于健康志愿者携带该等位基因人数 ($P < 0.05$)。在全身感染患者中, 与各自 1 号等位基因 (Allele1) 携带者病死率比较, IL-1A、IL-1B 和 IL-1RN 等 2 号等位基因 (Allele2) 携带者病死率均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 等位基因对健康志愿者体外培养外周血单核细胞分泌细胞因子能力的影响 (表 4, 表 5): 给予 LPS 刺激后, 单核细胞细胞因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra mRNA 表达和蛋白质分泌均显著增加; 等位基因 IL-1A 和 IL-1B 各等位基因对相应细胞因子 mRNA 表达和蛋白质合成无明显影响; 但是与等位基因 IL-1RN1 比较, IL-1RN2 携带者单核细

胞在 LPS 刺激后 IL-1ra mRNA 表达和蛋白质分泌显著升高($P < 0.01$)。

表 2 全身感染患者和健康志愿者携带各等位基因例数比较($n=60$)

Table 2 Allele frequency of IL-1 family genes in septic patients and health volunteers($n=60$)

组别	等位基因	等位基因 1	等位基因 2	等位基因 3	等位基因 4
正常对照组	IL-1A	41	24	5	3
	IL-1B	46	40	0	0
	IL-1RN	52	21	4	0
全身感染组	IL-1A	51	24	7	2
	IL-1B	44	47	0	0
	IL-1RN	51	34*	3	0

注:与正常对照组比较: * $P < 0.05$

表 3 等位基因对全身感染预后的影响

Table 3 Association of alleles in IL-1 family genes with the outcome of sepsis

等位基因	例数(例)	存活(例(%))	死亡(例(%))
IL-1A1	51	40(78.4)	11(21.6)
IL-1A2	24	13(54.2)*	11(46.8)*
IL-1B1	44	41(93.2)	3(6.8)
IL-1B2	47	31(65.9)**	16(34.1)**
IL-1RN1	51	40(78.4)	11(21.6)
IL-1RN2	34	18(52.9)*	16(47.1)*

注:与等位基因 1 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 等位基因对 LPS 刺激单核细胞 IL-1 α 、IL-1 β 及 IL-1ra mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Association of alleles in IL-1 family genes with IL-1 α , IL-1 β and IL-1ra mRNA expression in monocytes stimulated with LPS($\bar{x} \pm s$)

等位基因	例数(例)	生理盐水	LPS
IL-1 α mRNA	IL-1A1	41	0.81 \pm 0.15
	IL-1A2	24	0.76 \pm 0.21
IL-1 β mRNA	IL-1B1	46	0.53 \pm 0.13
	IL-1B2	40	0.55 \pm 0.17
IL-1ra mRNA	IL-1RN1	52	0.65 \pm 0.15
	IL-1RN2	21	0.71 \pm 0.11

注:与等位基因 1 比较: ** $P < 0.01$

2.3 等位基因对全身感染患者血浆细胞因子浓度

表 5 等位基因对细胞因子 IL-1 α 、IL-1 β 及 IL-1ra 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Association of alleles in IL-1 family genes with related cytokines IL-1 α , IL-1 β and IL-1ra production($\bar{x} \pm s$)

等位基因	上清液浓度(ng/L)		血浆浓度(ng/L)		
	生理盐水	LPS	全身感染者	正常对照者	
IL-1 α	IL-1A1	68.0 \pm 8.9(41)	801.0 \pm 151.0(41)	505.0 \pm 97.0(51)	17.1 \pm 2.5(41)
	IL-1A2	54.0 \pm 10.2(24)	783.0 \pm 203.0(24)	456.0 \pm 121.0(24)	13.6 \pm 3.4(24)
IL-1 β	IL-1B1	71.0 \pm 16.8(46)	452.0 \pm 138.0(46)	315.0 \pm 112.0(44)	21.5 \pm 3.3(46)
	IL-1B2	66.0 \pm 13.7(40)	514.0 \pm 109.0(40)	311.0 \pm 92.0(47)	28.8 \pm 6.4(40)
IL-1ra	IL-1RN1	35.0 \pm 5.5(52)	387.0 \pm 118.0(52)	247.0 \pm 73.0(51)	10.9 \pm 1.7(52)
	IL-1RN2	38.0 \pm 10.4(21)	604.0 \pm 225.0(21)**	426.0 \pm 103.0(34)*	12.2 \pm 2.8(21)

注:与等位基因 1 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; () 内为例数

的影响(表 5):与健康志愿者比较,全身感染患者的血浆 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra 浓度均升高 10 倍以上;等位基因 IL-1A1 与 IL-1A2、IL-1B1 与 IL-1B2 携带者之间相应细胞因子血浆浓度差异无显著性($P > 0.05$)。然而,等位基因 IL-1RN2 携带者血浆 IL-1ra 浓度显著高于 IL-1RN1 携带者($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来研究表明,机体对感染的反应性存在较大的个体差异。临床上亦发现,对于程度相似的感染,一部分患者全身炎症反应程度较轻,预后好;而另一部分患者反应重,病情发展快,易出现休克及多器官功能障碍综合征(MODS),预后差。1996 年,Stuber 发表论文指出,TNF B 基因多态性中等位基因 TNF B2 携带者对全身感染易感性增加,而且严重全身感染患者中 TNFB2 纯合子患者病死率显著高于其他基因型患者^[2]。随后的一些研究都证实,TNF 的其他类型基因多态性以及细胞因子 IL-1ra 和 IL-10 基因多态性与严重全身感染预后关系密切^[4,5]。由此可见,细胞因子基因遗传异质性可能是影响机体对感染反应性的重要因素之一。

IL-1 家族细胞因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra 在调控全身炎症反应以及促炎症/抗炎作用平衡等方面起十分重要作用。令人感兴趣的是,在其基因启动子、内含子中广泛存在基因多态性。而且,基础研究发现,某些等位基因对基因的转录以及蛋白质的表达具有调节作用。Hurme 等^[6]曾研究指出,携带等位基因 IL-1RN2(内含子 6,86 bp VNTR)的正常人血浆中 IL-1ra 浓度高于其他等位基因携带者。我们曾研究发现,细胞因子基因多态性等位基因中 IL-1B2/2 及 IL-1RN 2/2 纯合子基因型患者病死率明显高于其他基因型,且这两种基因型同时出现的全身感染患者病死率更高达 70%~80%^[7]。然而,IL-1 家族细胞因子基因多态性是否通过影

响相关细胞因子合成和释放,从而调节机体对炎症刺激的反应性是需要继续阐明的重要问题。

本研究结果显示,全身感染患者中,等位基因 IL-1RN2 携带者显著增多,并且病死率增加。体外研究证实,等位基因 IL-1RN2 较 IL-1RN1 携带者外周血单核细胞在受到 LPS 刺激时,细胞因子 IL-1ra 合成、分泌显著增加。众所周知,IL-1ra 是一种重要的抗炎症细胞因子,具有对抗促炎症细胞因子 IL-1 α 和 IL-1 β 生物活性,调节机体促炎症/抗炎症反应平衡的作用。当 IL-1ra 生成过多时,抗炎症反应过于强烈,机体出现代偿性抗炎症反应综合征(CARS),导致免疫麻痹状态。近年来临床上进一步认识到,CARS 可以发生在全身感染的早期,而且出现免疫低下的患者预后不良^[8]。从本研究结果可以看出,携带 IL-1RN2 等位基因的全身感染患者病死率增加可能与 IL-1RN 影响 IL-1ra 产生有关。本研究结果还发现,全身感染患者中,IL-1A2 和 IL-1B2 携带者病死率亦显著增加,但对相应细胞因子的产生并无显著影响,其作用机制尚不明确。可能的解释是,尽管上述基因改变不影响自身编码基因的表达,但对紧密相连的其他基因(如 IL-RN 等)功能可能产生影响,由此影响机体的反应性和全身感染预后。只有进一步综合研究与分析基因型(genotype)、基因型联合(association of genotype)甚至单体基因型(hepanotype)对相关基因功能的影响,才有可能从中得到有益的启示,找出全身感染高危遗传标志。

4 结 论

本研究得出如下启示:遗传因素可能是导致全

身感染患者之间发生炎症反应程度不同的重要原因。在 IL-1RN 基因多态性中,等位基因 IL-1RN2 携带者外周血单核细胞受到 LPS 刺激后细胞因子 IL-1ra 分泌及 mRNA 表达增加,该等位基因携带者发生全身感染时,机体内易出现过度免疫抑制,导致不良预后。

参考文献:

- 1 Bernal W, Donaldson P, Wendon J. Pro-inflammatory cytokine genomic polymorphism and critical illness [J]. Year Book of Intensive Care Medicine, 1999, 10: 18.
- 2 Stuber F, Peterson M, Frank B, et al. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma TNF α concentrations and outcome of patients with severe sepsis [J]. Crit Care Med, 1996, 24: 381-384.
- 3 马朋林, 陈德昌, 潘家琦, 等. 白细胞介素-1 家族细胞因子基因多态性对全身感染患者预后的影响 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82: 1237-1241.
- 4 Fang X M, Schroder S, Hoeft A, et al. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis [J]. Crit Care Med, 1999, 27: 1330-1334.
- 5 方向明, 舒强, 唐明山, 等. 白介素-10 基因多态性与术后脓毒症发生发展的相关研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 265-268.
- 6 Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1ra and IL-1 β genes [J]. Eur J Immunol, 1998, 28: 2598-2602.
- 7 Ma P L, Chen D C, Pan J Q, et al. Nitric oxide post-transcriptionally up-regulates LPS-induced IL-8 expression through p38 MAPK activation [J]. J Leukoc Biol, 2004, 76: 278-287.
- 8 林洪远, 盛志勇. 脓毒症免疫调理治疗的新思路 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 67-69.

(收稿日期: 2004-12-21 修回日期: 2005-03-23)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

“全国神经内科(脑血管)主任临床适宜技术规范应用高级研修班”通知

“全国神经内科(脑血管)主任临床适宜技术规范应用高级研修班”由中华医院管理学会主办, 拟定于 2005 年 5 月中旬在北京举办, 共 7 d, 会务费 960 元。学习期满授予学员 I 类继续教育学分。

1 内容: 微创颅内血肿穿刺治疗常规, 高血压脑出血的简易血肿穿刺定位方法, 脑卒中的监护, 颈动脉超声与 TCD 结合对颈动脉病变的检查, 卒中单元, 急性脑缺血的影像学检查, 高血压脑出血的外科治疗, 颈动脉斑块剥脱术与脑梗死的防治, 症状性脑动脉狭窄的血管内支架成形术, 糖尿病神经病变, 高血压药物治疗, 心房颤动与脑卒中, 缺血性脑血管病急诊治疗药物的评估, 急性脑梗死的溶栓治疗(静脉), 脑卒中的康复治疗, 缺血性脑血管病的治疗原则, 脑静脉闭塞的临床和影像学特点与血管内治疗等。

2 教师: 王拥军、龙洁、华扬、向红丁、刘国仗、李舜伟、顾征、胡大一、贺茂林、宿英英、戴建平、魏岗之等。

3 报名办法: 将姓名、单位、职务、职称、地址、邮编、电话寄至北京市东四西大街 46 号 5406 室中华医院管理学会科技开发部张君收, 邮编: 100711, 信封请注明: “神经科高研班”。电话: (010) 85416788/65238282, 传真: (010) 65238282, Email: chapx@sina.com。

(中华医院管理学会)