

中国汉族人群 *IL-1RA* 基因多态性及其与宫颈癌的相关性研究

姜君 薛雅丽 马琳琳 张云艳 郑冬梅 王哲 白静 傅松滨

【摘要】 目的 研究位于白细胞介素1受体拮抗剂基因(interleukin-1 receptor antagonist, *IL-1RA*)第2内含子中可变串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)多态性在中国3个汉族人群中的分布情况,并探讨其与宫颈癌的发生关系。方法 采用PCR方法分别对3个汉族人群206例个体以及42例宫颈癌患者和45例对照进行多态性检测,扩增产物进行2%的琼脂糖电泳。结果 3个汉族群体的基因型以 A_1/A_1 和 A_1/A_2 最为常见。等位基因以 A_1 频率最高, A_2 次之。群体间的差异是不显著的($P > 0.05$)。与美、英、高加索人群相比, A_1 的频率明显偏高, A_2 明显偏低,而与非洲黑人相近。在宫颈癌患者和正常对照人群中,该多态位点的等位基因和基因型频率均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 *IL-1RA* 第2内含子中VNTR多态性在不同种族间的分布存在着明显的差异,但与中国东北地区宫颈癌的发生可能无直接相关性。

【关键词】 *IL-1RA*; VNTR; 基因多态性; 宫颈癌

Interleukin-1 Receptor Antagonist (*IL-1RA*) Gene Polymorphism in Chinese Han Population and Association Study with Cervical Cancer JIANG Jun¹, XUE Ya-li¹, MA Lin-lin¹, ZHANG Yun-yan², ZHENG Dong-mei³, WANG Zhe¹, BAI Jing¹, FU Song-bin^{1,4}. (¹Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081; ²Department of Gynecological and Obstetric, the Third affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040; ³Department of Gynecology and Obstetrics, 211 Hospital of the People's Liberation Army, Harbin 150080; ⁴Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin 150081, P. R. China)

Corresponding author: FU Song-bin. E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of polymorphisms of the variable number of tandem repeats (VNTR) at intron 2 of interleukin-1 receptor antagonist (*IL-1RA*) gene in Chinese three Han populations and relationship with pathogenesis of cervical cancer. **Methods** The specific fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and were detected by running the amplicons on 2% agarose gel for 206 healthy subjects from Xinjiang, Fujian, Sichuan province and 42 patients with cervical cancer and 45 normal controls. **Results** A_1/A_1 and A_1/A_2 were the common genotypes in Chinese three Han populations. A_1 was the most frequent one and A_2 the second, there was no difference among Chinese three Han populations ($P > 0.05$). Compared with American and England Caucasians, the frequency of A_1 in Chinese three Han populations was higher, while A_2 lower, which was similar with Black South African. No difference was observed between the cervical cancer groups and the controls with respect to both the allele and genotype frequency of the *IL-1RA* gene polymorphisms. **Conclusion** *IL-1RA* intron 2 VNTR gene polymorphism were different in different ethnic populations, and might not be associated with cervical cancer in Chinese Northeast district.

【Key words】 *IL-1RA*; VNTR; Gene polymorphism; Cervical cancer

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 39993420);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20040226001)

作者单位:150081 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室(姜君、薛雅丽、马琳琳、王哲、白静、傅松滨);150040 哈尔滨医科大学附属第三医院妇产科(张云艳);150080 哈尔滨,中国人民解放军211医院妇产科(郑冬梅);150081 哈尔滨,黑龙江省生物医药工程重点实验室(傅松滨)

通讯作者:傅松滨(E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn)

白细胞介素1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, *IL-1RA*)作为一种前炎性细胞因子在免疫调节和炎症反应中起着重要的作用,是体内惟一一个天然的抗炎因子,与白细胞介素1A、1B合称为*IL-1*基因家族,位于染色体2q约430kb的范围内。后两者为分子激动剂,主要由单核细胞、巨噬细胞在

摄取抗原抗体复合物或抗原呈递过程中产生,与相应受体结合后引起细胞产生一系列生物学效应(从微生物的定植、感染到恶性转化),从而增加宿主对来自体内外刺激的应答能力。而 *IL-1RA* 通过竞争性抑制的原理特异性阻断 T 淋巴细胞表面 *IL-1* 与受体的结合,使转录信息无法启动,有效抑制 *IL-1* 在机体免疫应答、感染、炎症反应、组织损伤中的作用,降低许多疾病的严重程度。近年来,人们发现 *IL-1RA* 第 2 内含子中含有一个可变串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR),长度是 86bp,在不同人群中重复次数为 1~6 次不等^[1-5](见表 1)。众多研究表明,*IL-1RA* 基因多态性分布频率是有很大差异的,不仅表现在不同种族之间,在同一种群内不同地域的人群中也是有细微变化的。因此,了解 *IL-1RA* 基因多态性在正常人群中的分布特点是开展疾病相关性研究的前提。

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,发病率在女性恶性肿瘤中居第二位,并且新发病例和年轻病例也有逐年增加的趋势^[6]。因此,宫颈癌前病变的早期筛查与防治已引起人们的广泛重视。免疫因素在宫颈癌的发生发展中起着重要的作用^[7],而且细胞因子及其受体缺陷导致免疫抑制的患者,其宫颈癌的发病速度相对较快^[8]。已有的研究结果显示该多态性不但可能与基因的表达水平有关^[9],而且和宫颈癌的发生、发展具有一定的相关性^[10],但是该多态性与中国人群宫颈癌发生的相关研究未见报道。

本研究对 *IL-1RA* 基因第 2 内含子 VNTR 多态性在中国 3 个汉族人群中的分布特征及其与宫颈癌发病的相关性进行了初步探索,以探讨该基因多态性在中国人群宫颈癌发生中的作用,为进一步研究中国汉族人群遗传结构特征及其与宫颈癌相关的遗传背景的差异提供了重要的参考资料。

表 1 *IL-1RA* 基因第 2 内含子 VNTR 多态信息

Table 1 The general information of VNTR in *IL-1RA* intron 2

等位基因	重复次数	片段大小(bp)	特征
A ₀	1	154	极其罕见
A ₁	4	410	最常见
A ₂	2	240	与多种疾病相关
A ₃	5	325	少见
A ₄	3	500	罕见
A ₅	6	595	极其罕见

1 材料和方法

1.1 研究对象:206 名来自四川汉族、福建汉族、新疆汉族健康成年人的外周静脉血。42 名宫颈癌患者外周静脉血取自哈尔滨医科大学附属第三医院妇科,均为汉族,年龄在 50~55 岁,三代以内无血缘关系,45 例与其年龄、性别相匹配的对照组来自解放军 211 医院心血管内科,并排除系统性红斑狼疮、糖尿病、类风湿性关节炎、炎性肠病、胃癌病史。

1.2 主要仪器:微型高速冷冻离心机(Beckman),电子恒温水浴锅(DK-98-I,天津泰斯特公司),RNA/DNA 计算器(Pharmacia),DNA 热循环仪(Eppendorf),稳压稳流定时电泳仪(DYY-8 III 型,北京六一厂),紫外凝胶检测和成像系统(Bio-Rad)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取:取静脉血 1mL,用上海华舜生物公司的小剂量基因组 DNA 提取试剂盒进行抽提,按说明书使用。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性,并用 RNA/DNA 计算器检测 RNA 的浓度。

2.2 PCR 扩增:引物购自于 Sigma 公司,序列为:上游 5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3',下游 5'-TCCTG-GTCTGCAGGTAA-3'。反应体系:10 × Buffer 1.25μL;模板 DNA 50~100ng;4 × dNTP 各 1μL;PCR 引物各 0.8μL;Taq DNA 聚合酶 0.5U;加入 Nuclease-Free Water 至总体积 12.5μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 10min,94℃ 变性 1min,60℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,30 个循环,72℃ 延伸 10min,产物于 4℃ 保存。

2.3 基因分型:将 PCR 产物在 2% 琼脂糖胶上电泳 200V 40min,同时用溴化乙锭染色,在紫外灯下观察结果。

2.4 数据处理:等位基因和基因型频率的计算和比较以及 Hardy-Weinberg 平衡群体的判断均采用 Pearson χ^2 检验和双侧近似概率法, $P < 0.05$ 为显著性差异,处理数据使用 SPSS 11.5 软件。

3 结果

3.1 *IL-1RA* 第 2 内含子 VNTR 在中国 3 个汉族人群中的多态性分布:本研究采用简单的 PCR 方法成功检测了 *IL-1RA* 基因第 2 内含子中 VNTR 多态性。在 3 个汉族人群中我们共检测到 6 种基因型,如图 1 和表 2 所示。根据本实验得到的 3 个人群的基因型频率,用 SPSS 11.5 软件计算各等位基因频率,由于 A₁ 和 A₂ 在人群中的出现频率较高,所以我们将检

测到的其他等位基因合并统计。并且将本实验的数据与其他地区人群的多态信息进行比较(见表3)。

3.2 *IL-1RA* 基因第2内含子 VNTR 等位基因和基因型频率在宫颈癌患者和对照人群的分布:本研究共评价了宫颈癌组 42 例和健康对照组 45 例,经 χ^2 检验,基因型和等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有群体代表性。在所检样本中,只发现了两种常见的等位基因 A_1 、 A_2 和 3 种基因型 A_1/A_1 、 A_1/A_2 、 A_2/A_2 ,其中 A_2/A_2 仅在对照组中出现 1 例。经过统计学分析,等位基因及基因型频率在宫颈癌患者和对照人群中的分布频率均无显著差异(见表4)。

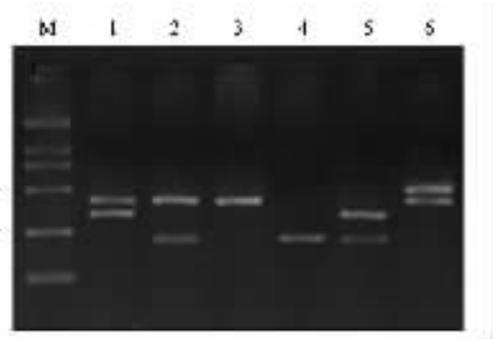


图1 *IL-1RA* 基因型在 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 The result of *IL-1RA* genotypes on 2% Agarose gel

M: Marker DL2000 1: A_1/A_4 ; 2: A_1/A_2 ; 3: A_1/A_1 ; 4: A_2/A_2 ; 5: A_4/A_2 ; 6: A_1/A_3

表2 *IL-1RA* 基因在中国 3 个汉族人群中的分布

Table 2 The distribution of *IL-1RA* gene polymorphism in Chinese 3 Han populations

人群	例数	基因型					
		A_1/A_1	A_1/A_2	A_2/A_2	A_1/A_4	A_1/A_3	A_4/A_2
福建汉族	89	68	18	1	1	1	0
四川汉族	79	60	17	0	0	1	1
新疆汉族	38	28	9	0	0	1	0

表3 *IL-1RA* 等位基因在中国 3 个汉族人群中的分布及其与其他地区人群的比较

Table 3 Allelic frequencies of *IL-1RA* polymorphism in several populations

人群	例数	等位基因频率		
		A_1	A_2	其他
新疆汉族	38	0.868	0.118	0.013
福建汉族	89	0.876	0.112	0.012
四川汉族	79	0.873	0.108	0.019
重庆汉族 ^[11]	112	0.920	0.080	0
广东汉族 ^[12]	156	0.910	0.087	0.003
湖北汉族 ^[13]	99	0.904	0.081	0.015
* 北美 ^[14]	200	0.740	0.233	0.029
* 英国 ^[15]	261	0.734	0.241	0.029
韩国 ^[16]	640	0.917	0.060	0.022

* $P < 0.05$

表4 宫颈癌患者和对照人群 *IL-1RA* 第2内含子 VNTR 基因型和等位基因的比较

Table 4 Comparison of *IL-1RA* intron 2 VNTR in case-control study

分组	样本数量	基因型频率*			等位基因频率*	
		A_1/A_1	A_1/A_2	A_2/A_2	A_1	A_2
病例	42	3(0.738)	11(0.262)	0(0)	7(0.869)	11(0.131)
对照	45	38(0.844)	6(0.133)	1(0.022)	8(0.911)	8(0.089)

* $P > 0.05$

4 讨论

4.1 *IL-1RA* 基因多态性在中国 3 个汉族群体中的研究结果分析: 虽然在本研究中观察到 6 种基因型, 但是最常见的仍然是 A_1/A_1 ($n = 156$) 和 A_1/A_2 ($n = 44$)。值得提出的是, A_2/A_2 ($n = 1$) 在所检测的人群中所占的比例并不是很大, 这与 Tarlow 等^[9]的结论有一定的出入。另外, 我们还检测到 4 种等位基因, 没有发现 $IL-1RA^*0$ 和 $IL-1RA^*5$, 进一步证实这两种等位基因的出现是极其罕见的。本研究中, 新疆汉族、福建汉族、四川汉族的 A_1 频率均为 0.87 左右, 而 A_2 频率也在 0.1 上下浮动, 3 个汉族群体间的差异是不显著的。将本试验得到的数据与其他地区人群进行比较, 发现 *IL-1RA* 基因多态性分布频率是有很大差异的。在高加索人群中, 英国、美国的 A_1 频率分别为 0.734、0.744, A_2 分别为 0.241、0.233。在亚裔群体中, 韩国的 A_1 频率为 0.917, A_2 为 0.060。可见, A_1 频率在亚洲人群中较高, 而 A_2 在欧美人群中出现的较为频繁。与欧美人群相比, 非洲黑人和亚洲人群的频率较为接近, 分别为 0.900 和 0.100^[17]。在国内, 来自不同省市地区的人群也有所不同, 但是这种差异是不显著的。重庆汉族分别为 0.920、0.080, 湖北汉族为 0.904、0.081, 广东汉族为 0.910、0.087。总的说来, 在种族之间存在较大的差异, 在同一种族内部存在细微的分化, 但是各人群的基因频率在总体上是趋于一致的。等位基因和基因型频率的差异可能是导致某种疾病在不同种族或人群中发病率和临床表现不尽相同的原因之一。通过研究该位点的多态性规律, 可以大概了解不同种族和不同人群的遗传结构和分化特征, 不仅丰富群体遗传学信息, 为人类进化提供了一些佐证, 更为与 *IL-1RA* 基因相关的临床疾病的大规模关联研究奠定了坚实的基础。

4.2 *IL-1RA* 基因多态性在病例对照中的研究结果分析: 宫颈癌的发生是多种因素相互作用的结果, 其中特定型别的 HPV 感染在宫颈癌的发生、发展过程中起重要的作用。由 *IL-1* 传导网络控制的宿主细胞介导的免疫应答不但影响宿主对 HPV 感染的易感性, 而且对 HPV 的侵袭也具有重要的影响。已有的体外试验结果显示, HPV DNA 诱导宫颈癌细胞中, 各种细胞因子(包括 *IL-1RA*) 的表达水平有明显的变化^[18]。日本学者 Fujiwaki 等^[19]对 38 例宫颈鳞

癌患者血清中的 *IL-1RA* 表达水平分析也表明, 该因子与宫颈鳞癌的骨盆淋巴结转移及预后相关。

已有的研究显示, 在 *IL-1RA* 基因第 2 内含子多态重复单位 86bp 中含有转录因子结合序列, 而且还存在 3 个潜在的蛋白质结合位点: α -干扰素沉默子 A、 β -干扰素沉默子 B 和急性反应元件, 由于 VNTR 数目不同, 所以所含的蛋白质结合位点的数目也不相同, 从而影响该基因的表达, 并与疾病的发生发展密切相关^[9]。因此, *IL-1RA* 基因第 2 内含子 VNTR 多态性在 *IL-1* 胞质系统中具有重要的作用。例如, Witkin 等^[5]证实等位基因 A_2 和自发流产高度相关。而 El-Omar 等^[20]和 Machado 等^[21]分别发现该基因多态性和胃癌的发生相关。Mustea 等^[10]研究发现 *IL-1RA* 中 A_1/A_2 基因型的分布在病例组(24.8%)与对照组(13.1%)相比存在统计学差异($P = 0.04$), 并提示等位基因 A_2 可作为宫颈癌的一个遗传易感因素。但是本研究中并未发现 *IL-1RA* 基因内含子 2 VNTR 多态性与宫颈癌发生的相关关系。由于本研究无法获得病例样本有关 HPV 感染的资料, 所以无法确定所测定样本中 HPV 的感染率, 可能由于病例中存在一定比例的 HPV 阴性, 从而影响关联分析的结果; 也可能在中国东北地区该病的发生具有很高的遗传异质性, 不同来源的病例和不同的遗传背景相关。在今后的研究中, 如能够扩大病例和对照组的样本量, 并结合其 HPV 的检测结果以及不同的临床分型和分期, 进行多个候选基因的多态性研究将会提供更全面、更准确地关联信息。

参 考 文 献

- 1 Arend WP, Malyak M, Guturidgeo CJ, et al. Interleukin-1 antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 27-55.
 - 2 Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist: a new member of the interleukin-1 family. *J Clin Invest*, 1991, 88: 1445-1451.
 - 3 Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist: discovery, structure and properties. *Prog Growth Factor Res*, 1990, 2: 193-205.
 - 4 Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996, 87: 2095-2147.
 - 5 Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis*, 2002, 34: 204-209.
 - 6 Lian LL. LIN QIAO ZHI *Gynecologic Oncology*, 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994. 227-243.
- [连丽娟. 林巧稚妇科肿瘤学, 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 227-243.]

- 7 Castello G, Esposito E, Stellato G, *et al.* Immunological abnormalities in patients with cervical carcinoma. *Ginecol Oncol*, 1986, 25 :61-64.
- 8 Schwartz LB, Cargangu ML, Bradham L, *et al.* Rapidly progressive squamous cell carcinoma coexisting with human immunodeficiency virus infection : clinical opinion. *Ginecol Oncol*, 1991, 41 :255-258.
- 9 Tarlow JK, Blackmore AIF, Lennard A. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86bp tandem repeats. *Hum Genet*, 1993, 91 :403-404.
- 10 Mustea A, Sehoul J, Konsgen D, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism in women with cervical cancer. *Anticancer Res*, 2003, 239 :1099-1102.
- 11 Liu X, Feng K, Jiang JX, *et al.* Polymorphisms of IL-1RA gene in Han population in Chongqing. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiariae*. 2002, 24 :200-201.
[刘兴, 冯凯, 蒋建新, 等. 中国重庆地区汉族群体白介素-1受体拮抗剂基因多态性分布的初步观察. 第三军医大学学报, 2002, 24 :200-201.]
- 12 Chen XH, Lin HQ, Li W, *et al.* Genetic polymorphism of IL-1RA in the Han of Guangdong. *J Modern Clin Med Bioengin*, 2003, 9 :223-224.
[陈雪环, 林辉强, 李玮, 等. 广东汉族人儿童白细胞介素-1受体拮抗剂基因多态性. 现代临床医学生物工程学杂志, 2003, 9 :223-224.]
- 13 Xu P, Li Y, Zhang PA. Study of the gene polymorphism in intron 2 of IL-1RA in Chinese Han population of Hubei. *Chin J Microcirc*, 2003, 13 :27-29.
[徐朴, 李艳, 张平安. 中国湖北地区 IL-1RA 内含子 2 基因多态性分布的研究. 微循环杂志, 2003, 13 :27-29.]
- 14 Tseng LH, Chen PJ, Lin MT, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) gene : further definition of the IL-1 β and IL-1RA polymorphisms in North American Caucasians and Taiwanese Chinese. *Tissue Antigens*, 2001, 57 :318-324.
- 15 Blakemore AIF, Cox A, Gonzalez AM, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist allele (IL-1RA* 2) associated with nephropathy in diabetes mellitus. *Hum Genet*, 1996, 97 :369-374.
- 16 Jae YU, Hyung MK. Frequencies of interleukin 1 gene polymorphisms in Koreans. *Clinical Chemistry*, 2003, 49 :2101-2102.
- 17 Pillay V, Caillard MC, Halkas A. Differences in the genotypes and plasma concentration of the Interleukin-1 receptor antagonist in black and white South African asthmatics and control subjects. *Cytokine*, 2000, 12 :819-821.
- 18 Iglesias M, Yen K, Gaiotti D, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1 α . *Oncogene*, 1998, 17 :1195-1205.
- 19 Fujiwaki R, Iida K, Nakayama K, *et al.* Clinical significance of Interleukin-1 receptor antagonist in patients with cervical cancer. *Gynecol oncol*, 2003, 89 :77-83.
- 20 El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, *et al.* Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 2000, 404 :398-402.
- 21 Machado JC, Haroah P, Ousa S, *et al.* Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 2001, 121 :823-829.

(收稿日期 2006-01-08)

(本文编辑 高巍)

(上接 163 页)

- 8 Tahvanainen E, Ranta S, Hirvasniemi A, *et al.* The gene for a recessively inherited human childhood progressive epilepsy with mental retardation maps to the distal short arm of chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 :7267 - 7270.
- 9 Zhong N, Ju W, Moroziewicz DN, *et al.* molecular pathogenic studies of Batten disease : Identification and characterization of Battenin-interactive proteins. *J Mol Diagn*, 1999, 1 :43.
- 10 Zhong N, Moroziewicz DN, Ju W, *et al.* CLN-encoded proteins do not interact among each other. *Neurogenetics*, 2000, 3 :41 - 44.
- 11 Vesa J, Chin MH, Oelgeschlager K, *et al.* Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level : interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol Biol Cell*, 2002, 13 :11 - 25.
- 12 Zhong N. neuronal ceroid lipofuscinoses and possible mechanism. *Molecular genetics and metabolism*, 2000, 71 :195 - 206.
- 13 Lonka L, Kyttälä A, Ranta S, *et al.* The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet*, 2000, 9 :1691 - 1697.
- 14 Han L, Zhang XJ, Huang SS, *et al.* MAATI p15 Interacts with LRP6 and regulates wnt signaling pathway. *Chin J Biochem Mol Bio*, 2004, 20 :827 - 832.
[韩亮, 张新军, 黄世思, 等. 黑色素瘤相关抗原 MAATI_{p15} 与 LRP6 的相互作用及其对 Wnt 信号通路的调控. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20 :827 - 832.]
- 15 Zhang Y, Yang J, Wu NH, *et al.* Screening, cloning, and analyzing for hSNF5 binding proteins in human fatal brain. *Acta Academiae Medicinae Sinica*, 2004, 26 :529 - 532.
[张怡, 杨珺, 吴宁华, 等. 人胎脑中 hSNF5 结合蛋白的筛选、克隆及分析. 中国医学科学院学报, 2004, 26 :529 - 532.]

(收稿日期 2004-10-08)

(本文编辑 高巍)