

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.02.017

论著·临床研究

IL-1 β -511T 基因 rs16944 多态性与热性惊厥的关联研究

任晓曦^{1,2} 孙素真² 刘芳³ 王晓明²

(1. 首都医科大学附属北京儿童医院神经康复中心, 北京 100045;
2. 河北省儿童医院神经内科, 河北 石家庄 050031;
3. 北京军区总医院附属八一儿童医院内科, 北京 100700)

[摘要] **目的** 致热因子白细胞介素1(IL-1 β)基因多态性是否参与热性惊厥(FS)的发病目前仍存在争议,该研究将探讨中国北方汉族儿童热点基因IL-1 β -511T的单核苷酸(SNP)rs16944多态性与FS发病的关联性。**方法** 用SNaPshot SNP分型技术对141例单纯型FS患儿和130例健康对照进行IL-1 β -511T基因rs16944位点分型,比较该SNP基因型和等位基因频率的差异。**结果** 与对照组相比,病例组rs16944多态性的基因型和等位基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$);rs16944多态性3种基因型A/A、A/G、G/G的FS患儿的临床特征比较,显示首次惊厥的年龄($\chi^2=19.491, P<0.01$)、首次惊厥的体温($\chi^2=9.317, P<0.05$)、有无FS家族史($\chi^2=26.798, P<0.01$)差异均具有统计学意义。**结论** IL-1 β -511T基因rs16944多态性与北方汉族儿童单纯FS的发病无关联,但其基因型不同可能与患儿FS的发生及预后有关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(2): 181-184]

[关键词] 热性惊厥; 白细胞介素1 β ; 单核苷酸多态性; 儿童

Association of IL-1 β -511T gene rs16944 polymorphism with febrile seizures

REN Xiao-Tun, SUN Su-Zhen, LIU Fang, WANG Xiao-Ming. Neurology and Rehabilitation Center, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100045, China (E-mail: rxt1997@126.com)

Abstract: Objective Despite substantial research efforts worldwide, the role of inflammatory cytokine IL-1 β in the onset of febrile seizures (FS) remains controversial. The aim of this study was to assess the relationship between rs16944 polymorphism of the IL-1 β -511T gene and occurrence of simple FS in a sample of Han children in northern China. **Methods** The IL-1 β -511T gene rs16944 was genotyped by SNaPshot SNP technique in 141 FS children and 130 healthy control subjects. The genotypic and allelic frequencies in the two groups were comparatively analyzed. **Results** There were no significant differences in genotypic and allelic frequencies of rs16944 polymorphism of the IL-1 β -511T gene between FS patients and control subjects ($P>0.05$). When the clinical data on A/A, A/G and G/G genotypes of the rs16944 polymorphism in FS patients, there was statistically significant difference in age of first onset ($\chi^2=19.491, P<0.01$), temperature of first onset ($\chi^2=9.317, P<0.05$) and family history of FS ($\chi^2=26.798, P<0.01$). **Conclusions** There is no association between rs16944 polymorphism of the IL-1 β -511T gene and the incidence of FS in Han children in Northern China. However, the differences in genotypes of this polymorphism might be associated with pathogenesis and prognosis of simple FS in the population studied. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(2): 181-184]

Key words: Febrile seizure; IL-1 β ; Single nucleotide polymorphism; Child

热性惊厥(febrile seizure, FS)是儿童期由急性发热(排除中枢神经系统感染或损伤)诱发的惊厥发作。大部分患儿预后良好,2%~10%患儿

可能发展为无热惊厥或癫痫。尽管全面性癫痫伴FS附加症已有明确的遗传基因,但这些突变不包含一定谱系之外的大多数病人,因此,寻找

[收稿日期] 2013-06-07; [接受日期] 2013-11-23
[基金项目] 河北省卫生厅重点科研项目(20090002)。
[作者简介] 任晓曦,女,博士,主任医师。

某一特定的因素早期预警 FS 患儿的发病及其转归引起很多学者的兴趣。目前研究发现 FS 与遗传、免疫、神经递质等多种因素有关，而免疫反应在 FS 的病理生理过程中起重要作用，特别是发热前炎症因子在周围或中枢系统的释放，例如：炎症因子 IL-1 β 表达的增加和释放增加了惊厥的易感性，其基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 FS 的发生有关^[1]。越来越多的研究表明，虽然炎症因子基因具有多态性，但不同的等位基因产生细胞因子的能力不同，且目前关于 IL-1 β 的 SNP 在 FS 的发病中的作用仍然存在争议^[2]。因此，本研究进一步探讨患儿单纯性 FS 发病与 IL-1 β 的 SNP 的关联性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例组来自 2010 年 12 月至 2011 年 12 月河北省儿童医院神经内科门诊和北京军区总医院附属八一儿童医院内科病房的 141 例汉族 FS 患儿，按照 FS 诊断标准^[3] 入组，且智能运动发育正常。141 例患儿中，男 94 例，女 47 例，年龄 6 个月至 5 岁，其中有 FS 家族史患儿 78 例，首次出现 FS < 1 岁者 33 例，首次惊厥体温 < 38.5 $^{\circ}$ C 者 18 例。排除标准：患儿脑电图有癫痫样放电或影像学异常，惊厥持续时间 > 15 min 以上，存在中枢神经系统感染证据，为局灶型发作形式。对照组为 130 例年龄、出生地域与病例组相同的汉族北方健康儿童，男 78 例，女 52 例。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 经家属同意并签署知情同意后，取患儿肘静脉血 2 mL，采用 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技) 提取 DNA，并 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 基因型检测 本研究以目前有争议的 IL-1 β -511T 的多态性位点 rs16944 为研究靶点，利用 SNaPshot SNP 分型技术 (美国应用生物公司 ABI) 对 IL-1 β -511T 基因 rs16944 位点分型。

1.2.3 引物设计合成 根据 SNP 位点序列信息，采用 Primer 5 软件设计并合成 IL-1 β -511T 扩增引物和延伸引物 (5' \rightarrow 3')，扩增引物序列为：上游 TGGCATTGATCTGGTTCATC，下游 GTTTAGGAATCTTCCCCTT；延伸引物序列为：tttttttttttttttCCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCT。经过预扩增、预扩增产物纯化、延伸反应、延伸产物纯化，最后 3730 XL 测序仪检测，将检测得到的原始数据导入分析软件中进行分析。

1.3 统计学分析

采用 Excel 2007 建立数据表，SPSS 16.0 统计学软件进行数据统计学分析。采用拟合优度 χ^2 检验 SNP 位点基因型分布频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。各组等位基因频率和基因型采用频数和率进行统计描述，各组间等位基因频率和基因型的分布差异采用 χ^2 检验进行比较，logistic 回归分析多态性位点和 FS 之间的相关性，风险度采用比值比 (OR) 及其 95% 置信区间 (CI) 表示； $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组基因型和等位基因频率比较

病例组与对照组的 rs16944 多态性基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。对 rs16944 位点进行 χ^2 检验显示，A/A、A/G、G/G 基因型和 A、G 等位基因频率在病例组和对照组间差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)，见表 1。

表 1 病例组及对照组的 IL-1 β -511T 基因型及等位基因情况 [例 (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		A/A	A/G	G/G	A	G
对照组	130	32(24.6)	79(60.8)	19(14.6)	143(55.0)	117(45.0)
病例组	141	45(31.9)	70(49.7)	26(18.4)	160(56.7)	122(43.3)
OR(95%CI)		0.630(0.361, 1.098)			0.932(0.664, 1.309)	
χ^2 值		2.6527			0.166	
P 值		0.1034			0.684	

2.2 病例组不同临床特征患儿的基因型分析

对病例组 141 例患儿分别进行 logistic 回归分析多态性位点 rs16944 和临床资料之间的相关性发现, 男儿童的基因型差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.888, P > 0.05$), 对是否有 FS 家族史 ($\chi^2 =$

26.798, $P < 0.01$ 、首次惊厥发作年龄是否 < 1 岁 ($\chi^2 = 19.491, P < 0.01$)、首次发作时的体温 ($\chi^2 = 9.317, P < 0.05$) 3 种情况进行基因型分析, 差异均具有统计学意义, 见表 2。

表 2 病例组不同临床特征患儿的 IL-1 β -511T 基因分型情况 [例(%)]

项目	例数	A/A	A/G	G/G	χ^2 值	P 值
性别						
男	94	28(30)	47(50)	19(20)	0.888	0.642
女	47	17(36)	23(49)	7(15)		
FS 家族史						
有	78	15(19)	54(69)	9(12)	26.798	<0.01
否	63	30(48)	16(25)	17(27)		
首次惊厥的年龄						
<1 岁	33	2(6)	18(55)	13(40)	19.491	<0.01
≥ 1 岁	108	43(40)	52(48)	13(12)		
首次惊厥时体温						
<38.5 $^{\circ}\text{C}$	18	1(6)	10(56)	7(39)	9.317	0.010
$\geq 38.5^{\circ}\text{C}$	123	44(36)	60(49)	19(16)		

3 讨论

FS 是由发热引起并只发生在儿童期的惊厥形式, 施旭来等^[3]对温州地区的 FS 发病研究显示, 首次发病年龄多在 6 个月至 3 岁, 患病率 3.67%。单纯性 FS 通常被认为是一良性过程。早在 1990 年 Helminen 等^[4]首次提出发热患儿的前炎症因子 IL-1 β 反应增强可能对惊厥发生起重要作用, 发热过程中, IL-1 β 这一诱导发热的内源性致热源是血脑屏障通透性破坏的重要扳机点, 成为惊厥发病机制中重要的辅助因素。动物研究发现在惊厥发生前 IL-1 β 血浆中浓度明显升高, 并与海马及其他区域的神经元表达的 IL-1R 结合, 提高了神经元兴奋性和降低了惊厥的阈值, 从而诱导惊厥发生^[5], 而在 FS 患儿海马和下丘脑处 IL-1 β 明显升高^[1], 提示 FS 可能起源于海马。而 IL-1 β 的 SNP 与脂多糖处理后的单核细胞产生更多的 IL-1 β 有关, 研究认为, 其 SNP 参与了 FS 的发生^[1], 特别是发现 IL-1 β -511T 这个能促进细胞因子表达的变异体与儿童 FS 有关, 一直以来由于研究方法、人群的不同, 对于 IL-1 β 是否能真正作为 FS 预警标记依然存在着争议^[2,6-9]。特别是在上世纪 60 年代发现难治性颞叶癫痫患儿中大约 50%~70% 的病人儿童期都有 FS 病史^[1], 因此, 患儿是否发生 FS

或其最终能否转化为癫痫的决定因素成为研究的热点。目前研究普遍认为遗传因素、免疫反应、神经递质可能共同参与了 FS 的病理生理过程, 多个基因的 SNP 可能是其发病的基因学基础。

SNP 是人类可遗传的变异中最常见的一种, 占有已知多态性的 90% 以上, 关联研究是目前研究复杂性多基因疾病的主要方法。本研究应用关联研究的方法, 针对具有争议的 IL-1 β -511T rs16944 位点采用 SNaPshot 技术确定中国北方 FS 儿童样本基因型, 结果显示位点 rs16944 的 A/A、A/G、G/G 基因型和 A、G 等位基因频率在病例组和对照组间差异无统计意义, 说明 SNP16944 与北方汉族 FS 患儿的惊厥发作无关联。而本研究 FS 组中首次 FS 的年龄是否 < 1 岁、首次惊厥时的体温是否 $< 38.5^{\circ}\text{C}$ 及是否有 FS 家族史的患儿其 IL-1 β -511T 的 SNP 的基因型存在显著差别, 表现为年龄 < 1 岁、首次惊厥体温 $< 38.5^{\circ}\text{C}$ 和有 FS 家族史的患儿基因型以 A/G 为主, 因此, 推测 IL-1 β -511T 的 SNP 虽不能作为提示 FS 发病的标记基因, 但其基因型的不同可能与患儿 FS 的发生及预后有关。

由于 IL-1 β -511T 的 SNP 与 FS 关联研究的结论存在不一致^[10-12], 其原因可能与 FS 是由多个 SNP 位点通过连锁作用对氨基酸的编码剪切、基因

的表达以及蛋白质结构等各个环节发生影响,进而调节基因功能有关,研究单个基因的单一 SNP 可能会割裂多基因多 SNP 相互之间对 FS 的共同影响^[13];其次,散发的单纯性 FS 遗传倾向分析较为复杂,尚不能够通过精细的基因型和基因频率的差异对 FS 表型分类的风险性进行解释说明,而家系、种群、表型等误差也可能造成假阴性的结果。因此,研究单个 SNP 与多基因疾病的关系需要选择更多的样本包括更大的家系,其准确性有待于进一步扩大样本求证,而人类全基因组 SNP 关联研究的实现,也许才能真正了解 FS 的基因学特点。

总之,早期检测患儿的 IL-1 β -511T 基因型对 FS 的发生及转归有一定的预警作用,推测有家族史、起病早、较低体温出现惊厥发作的患儿,发展成癫痫的可能性较大。

[参 考 文 献]

- [1] Heida JG, Moshe SL, Pittman QJ. The role of interleukin-1beta in febrile seizures [J]. *Brain Dev*, 2009, 31(5): 388-393.
- [2] Nakayama J. Progress in searching for the febrile seizure susceptibility genes [J]. *Brain Dev*, 2009, 31(5): 359-365.
- [3] 施旭来, 林忠东, 叶秀云, 等. 温州地区小学生热性惊厥流行病学调查 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(2): 128-130.
- [4] Helminen M, Vesikari T. Increased interleukin-1 (IL-1) production from LPS-stimulated peripheral blood monocytes in children with febrile convulsions [J]. *Acta Paediatr Scand*, 1990, 79(8-9): 810-816.
- [5] Dube CM, Brewster AL, Baram TZ. Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy [J]. *Brain Dev*, 2009, 31(5): 366-371.
- [6] Virta M, Hurme M, Helminen M. Increased frequency of interleukin-1 beta (-511) allele 2 in febrile seizures [J]. *Pediatr Neurol*, 2002, 26(3): 192-195.
- [7] Nur BG, Sahinturk D, Coskun M, et al. Single nucleotide polymorphism and production of IL-1 β and IL-10 cytokines in febrile seizures [J]. *Neuropediatrics*, 2012, 43(4): 194-200.
- [8] Chou IC, Lin WD, Wang CH, et al. Interleukin (IL)-1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-6, IL-8, IL-10, and tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in patients with febrile seizures [J]. *J Clin Lab Anal*, 2010, 24(3): 154-159.
- [9] Kira R, Torisu H, Takemoto M, et al. Genetic susceptibility to simple febrile seizures: interleukin-1beta promoter polymorphisms are associated with sporadic cases [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 384(3): 239-244.
- [10] Wu ZQ, Sun L, Sun YH, et al. Interleukin 1 beta -511 C/T gene polymorphism and susceptibility to febrile seizures: a meta-analysis [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5401-5407.
- [11] Tsai FJ, Hsieh YY, Chang CC, et al. Polymorphisms for interleukin 1 beta exon 5 and interleukin 1 receptor antagonist in Taiwanese children with febrile convulsions [J]. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2002, 156(6): 545-548.
- [12] Matsuo M, Sasaki K, Ichimaru T, et al. Increased IL-1beta production from dsRNA-stimulated leukocytes in febrile seizures [J]. *Pediatr Neurol*, 2006, 35(2): 102-106.
- [13] Chabris CF, Hebert BM, Benjamin DJ, et al. Most reported genetic associations with general intelligence are probably false positives [J]. *Psychol Sci*, 2012, 23(11): 1314-1323.

(本文编辑: 王晓莉)