

白细胞介素基因多态性与桂西地区妇女乳腺癌遗传易感性研究^①

李美江

(右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000 E-mail: mj761020@163.com)

摘要: **目的** 研究白细胞介素-8(IL-8)基因和白细胞介素-10(IL-10)基因的基因多态性与桂西地区妇女乳腺癌遗传的关系。**方法** 应用酶联免疫吸附反应检测健康对照组和乳腺癌组血清中IL-8和IL-10的含量,用PCR-RFLP分析方法检测两组中的IL-8基因和IL-10基因的基因多态性;用Logistic回归模型方法计算基因型的乳腺癌风险(OR)和95%可信区间。**结果** 乳腺癌组中IL-8的含量显著升高,而IL-10的含量显著降低;IL-10基因中的-1082AA、-819CC增加乳腺癌发生的风险。**结论** 两组对照研究结果对诊断女性乳腺癌有临床指导意义。

关键词: 白细胞介素-8; 白细胞介素-10; 基因多态性; 乳腺癌; 疾病遗传易感性

中图分类号: R363.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)03-0339-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.03.007

The relationship between interleukin gene polymorphism and females genetic susceptibility to breast cancer in Western Guangxi

Li Meijiang

(Affiliated Hospital of Youjiang Medical Universities, Baise 533000, Guangxi, China
E-mail: mj761020@163.com)

Abstract: **Objective** To study the relationship between interleukin-8 (IL-8) and interleukin 10 (IL-10) gene polymorphisms and women breast cancer genetics in Western Guangxi. **Methods** The content of serum IL-8 and IL-10 in healthy controls and breast cancer group were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay, and gene polymorphisms of IL-8 and IL-10 genes were measured by using PCR-RFLP analysis method. The Logistic regression model method was used to calculate the genetic type of breast cancer risk (OR) and 95% confidence interval. **Results** The content of IL-8 in breast cancer group increased significantly, and IL-10 levels reduced significantly. In IL-10 genes, genotypes -1082 AA and -819 CC could enhance the risk of breast cancer. **Conclusion** The comparative study results can clinically guide the diagnosis of women breast cancer.

Key words: interleukin-8; interleukin-10; genetic polymorphism; breast cancer; genetic predisposition to disease

近几十年来,乳腺癌已经成为威胁妇女健康的重要疾病之一,在我国,乳腺癌的发病率也呈显著增长的趋势^[1]。引发乳腺癌的因素有很多,其中白细胞介素-8(IL-8)和白细胞介素-10(IL-10)是两种与乳腺癌相关的因子。IL-8是典型的炎性细胞趋化因子,可以趋化并激活中性粒细胞,参与肿瘤的发生发展。IL-8基因位于染色体4q12-21,基因组有三个内含子和七个外显子。Snoussi等^[2]研究显示携带有-251AA基因型与-251TA基因型都可以使患乳腺癌的风险性升高。Wang等^[3]研究发现对IL-8基因位点与肿瘤发生的关系进行了Meta分析,结果显示携带251A基因的人乳腺癌的发病率增高。IL-10能抑制单核细胞和巨噬细胞的功能,既能抑制肿瘤形成又能促进其发生。IL-10基因定位于染色体1q31-1q32,三个启动子区的位点(-1082A/G、-819T/C、-592A/C)是近年来研究的热点。Howell等^[4]分析了IL-10基因启动子区的多态性位点,结果表明-1082AA低表达基因型与乳腺癌的易感性相关,同时证实-592AA基因型与降低乳腺癌危险

性有关。Gerger等^[5]研究显示-592C/A位点与乳腺癌的转移密切相关。为了研究桂西地区妇女乳腺癌遗传易感性的因素,本文以IL-8和IL-10为研究指标,以揭示桂西乳腺癌患者血清中IL-8、IL-10的水平变化,阐明该病在这些细胞因子所起的作用机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择桂西地区2003年7月~2014年7月期间的乳腺癌患者128例,健康对照组128例。乳腺癌组年龄在32~63岁之间,平均(49.62±7.85)岁,绝经86例(67.19%);对照组年龄在31~63岁之间,平均年龄(48.99±9.03)岁,绝经78例(60.94%)。两组间的年龄、绝经构成情况,差异均无统计学意义,具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 取样 清晨采集乳腺癌组和健康对照组空腹静脉血5ml,样品加入枸橼酸钠(EDTA),放入-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 IL-8和IL-10含量的测定 采用双抗体夹心ELISA

① 基金项目:广西百色市科研项目(百科计20130124)

法检测样本中 IL-8 和 IL-10 的浓度。取不同浓度标准品,每孔注入 100 μ l;每孔,加入样品中加入 50 μ l 样本分析缓冲液,再加入血清样品 50 μ l,用封板胶纸封住反应孔,室温孵育 120 min。然后用清洗液清洗板子,拍干,反复 5 次。接着每孔加入生物素化抗体工作液 100 μ l,用封板胶纸封住反应孔,室温孵育 60 min。取出用清洗液清洗板子,拍干,反复 5 次。然后每孔加入酶结合物工作液 100 μ l,用封板胶纸封住反应孔,避光室温孵育 20 min。取出后用清洗液清洗板子,拍干,反复

5 次。最后每孔加入显色剂 100 μ l,避光室温孵育 20 min,加入终止液 50 μ l,混匀后在 450 nm 处测量 OD 值。建立标准曲线计算样品 IL-8 和 IL-10 的含量。

1.2.3 IL-8 和 IL-10 的基因多态性的检测 应用 Primer 5.0 软件,根据 GENEBANK 提供的人类基因组序列确定实验引物,见表 1 和表 2。对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,用凝胶成像仪成像观察结果。

表 1 确定的 IL-8 引物详情表

引物		PCR 产物	内切酶	
-251	上游	5'-AGCTCCACAATTTGGTGAATTATTAA-3'	113 bp	Ase I
	下游	5'-TGATCTTGTCTAACACCTGCCA-3'		
+860	上游	5'-TGTTGTTGCGGCGCTCAGAG-3'	141 bp	Sac I
	下游	5'-AGAAGCACCGAGCCATGAGGGT-3'		

表 2 确定的 IL-10 引物详情表

引物		PCR 产物	内切酶	
1082	上游	5'-CTAAGA GCA TCC GCT TGC ACC T-3'	486 bp	Mse I
	下游	5'-TTG GTG TGA TGC ACA GAA GCC TTT T-3'		
-819	上游	5'-AAATGAATT GACTG GAT GGT-3	247 bp	Mse I
	下游	5'-TTACGAGAAAGG AAG CCG TG-3'		

1.2.4 统计学方法 数据采用 SPSS 17.0 分析软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较时进行 t 检验或 t' 检验,基因型和等位基因频率用直接计数的方法,卡方检验比较组间基因型和等位基因频率分布差异,以比值比(Odds ratios, OR)及其 95% 可信区间(confidence intervals, CI)表示相对风险度。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-8 和 IL-10 含量测定结果 对于 IL-8,用 OD 值(y)对 IL-8 浓度(x)进行线性回归,回归方程为 $y = 0.0035x + 0.1103$ ($R^2 = 0.9911$),IL-8 浓度(x)范围为 0~250 pg/ml;对于 IL-10,用 OD 值(y)对 IL-10 浓度(x)进行线性回归,回归方程为 $y = 0.0014x + 0.1856$ ($R^2 = 0.9917$)($R^2 = 0.9911$),IL-10 浓度(x)范围为 0~200 pg/ml。测定人体血清中 IL-8 和 IL-10 的含量见表 3。通过表 3 可知,乳腺癌组中 IL-8 的含量显著升高,而 IL-10 的含量显著降低。

表 3 乳腺癌组与对照组 IL-8、IL-10 含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	n	IL-8	IL-10
对照组	128	112.34 \pm 14.32	12.2 \pm 1.9
乳腺癌组	128	360.73 \pm 23.3	7.9 \pm 9.0
t'		72.659	3.740
P		< 0.05	< 0.05

2.2 IL-8 和 IL-10 基因的基因型分布与乳腺癌易感性的关系 采用 Logistic 回归分析 IL-8 基因和 IL-10 基因的基因型与乳腺癌发病风险间的关系,结果见表 4、表 5,结果表明:在 IL-10 基因中,携带基因型-1082AA 比基因型-1082AG 和-1082GG 引发乳腺癌的风险大,同时携带基因型-819CC 比基因型-819CT 和-819TT 会增加乳腺癌发生的风险。

表 4 IL-8 基因的基因型分布与乳腺癌易感性的关系

基因类型	对照组 (%)	乳腺癌组 (%)	OR (95% CI)
-251A/T			
TT	34.67	38.67	1.00
AT	41.33	42.67	0.91(0.69~1.34)
AA	13.33	14.67	0.86(0.57~1.29)
AT/AA	65.33	61.33	0.91(0.77~1.21)
+860G/C			
GG	82.67	81.33	1.00
GC	14.67	17.33	1.46(0.99~1.98)
CC	1.33	1.33	0.57(0.16~1.79)
GC/CC	17.33	18.67	1.38(0.93~1.81)

表 5 IL-10 基因的基因型分布与乳腺癌易感性的关系

基因类型	对照组 (%)	乳腺癌组 (%)	OR (95% CI)
-1082A/G			
AA	62.67	74.67	1.00
AG	37.33	25.33	1.82(1.17~2.88)
GG	2.67	1.33	2.27(1.02~4.19)
AG+GG	37.33	25.33	1.93(1.24~3.15)
-819C/T			
CC	74.67	82.67	1.00
CT	26.67	17.33	2.19(1.32~3.56)
TT	2.67	1.33	2.57(1.16~4.71)
CT+TT	25.33	17.33	2.13(1.27~3.34)

(下转第 343 页)

(mRNA)、转化生长因子- β (TGF- β)的升高^[6-7]。

目前矽肺治疗药物可以用来减轻患者症状,延缓病情进展,改善健康状况。但仍未找到能阻断或逆转矽肺病情进展药物和治疗方法,不能显著改善患者肺功能长期下降的趋势。

本实验证明,三组尘肺患者肺功能各指标均有下降趋势,予药物干预后,NAC组DLco下降幅度延缓,矽肺宁组及空白组DLco下降明显($P < 0.05$),且空白组与NAC组差值对比DLco下降明显($P < 0.05$)。血气分析提示:NAC组PCO₂、PO₂较前有好转,PCO₂减低,PO₂有提高。矽肺宁组及空白组PCO₂、PO₂较前均有下降趋势。

NAC可以改善尘肺患者肺功能及低氧血症,提高生活质量,延长患者生命。NAC不仅有强大的抗氧化作用,在气道炎症中也发挥着重要作用,可使痰液中黏蛋白水解促进痰液排出,还能加速纤毛摆动的速度,增加黏膜纤毛清除率^[8]。

本研究因样本量偏小,且尘肺患者纤维化进程较慢,随访时间长、难度大,血样及灌洗液标本保存、检测均有困难,课题还需要进一步完善。

参考文献:

- [1] 卫生部职业病诊断标准专业委员会. GBZ70 2009 尘肺病诊断标准[S]. 北京:人民卫生出版社,2009.
- [2] 陈志军,张健杰,李冬红. 大剂量乙酰半胱氨酸对矽肺患者血清中IL-6、TNF- α 及肺功能的影响[J]. 职业与健康

康,2012,28(11):1311-1313.

- [3] 李文芳,张艳. 矽肺患者肺功能状况调查分析[J]. 中国实用医药,2010,5(31):24-25.
- [4] Cu A, Ye Q, Sarria R, et al. N-acetylcysteine inhibits TNF- α , sTNFR, and TGF- β 1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis in vitro [J]. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2009, 26(2): 147-154.
- [5] Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-Dose Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis [J]. N Engl J Med, 2005, 353(21): 2229-2242.
- [6] 王海涛,高俊玲,田艳霞,等. N-乙酰-L-半胱氨酸对二氧化硅致大鼠肺成纤维细胞基质金属蛋白酶表达升高的抑制[J]. 中华劳动职业病卫生杂志, 2006, 24(9): 514-517.
- [7] 刘婷,孙莹,柳明坤,等. N-乙酰半胱氨酸对大鼠肺纤维化模型中TGF- β 1表达影响的研究[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(11): 1508-1511.
- [8] 钱秀芬,袁民宇,卞涛. N-乙酰半胱氨酸治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期炎症61例[J]. 中国药业, 2013, 22(5): 41-42.

收稿日期:2014-04-30;修回日期:2014-05-22

(上接第340页)

3 讨论

作为趋化因子,IL-8是一种主要由单核-巨噬T细胞和血管内皮细胞产生的二聚体糖蛋白,IL-8可以加强免疫反应,在多种恶性肿瘤组织中检测到IL-8高表达,并发现同乳腺癌生成、生长、转移与复发等密切相关^[6-9]。作为一种重要的免疫抗炎因子,IL-10也被称为人类细胞因子合成抑制因子,IL-10主要是单核细胞产生的,也可由淋巴细胞产生,IL-10在免疫调节和炎症反应中有多效性,既可以下调巨噬细胞表面的Th1类细胞因子,同时也可以增强B细胞的存活率,抑制肿瘤细胞的增殖,从而控制其生长。IL-10在为肿瘤细胞营造一个免疫耐受的微环境中发挥了不同的生物学功能。因此,血清中IL-8升高可以显示免疫反应的增加,而血清中IL-10的降低表明了抑制肿瘤细胞能力的减弱^[10],这可以从一方面显示是否存在乳腺癌。

分子生物学研究表明IL-8和IL-10基因的多态性可能与肿瘤遗传易感性的存在一定的关系^[11]。由于基因的多态性和民族种族、地域差异有一定的联系,因此,白细胞介素的基因多态性在桂西地区妇女乳腺癌的遗传中有一定的规律性,因此,在用酶联免疫吸附反应检测血清中IL-8和IL-10的基础上,进行的聚合酶链反应-限制性片段长度多态性PCR-RFLP方法检测的筛选出的桂西地区妇女乳腺癌易感基因有一定的代表性,可以揭示该地区遗传基因与乳腺癌的关系,能为该地区乳腺癌的发生、发展阐明一定的机制,值得进一步研究应用。

参考文献:

- [1] 唐志柳,白洁,顾丽娜,等. 2000~2010年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性综述[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(4): 260-265.
- [2] Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, et al. Combined

effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 283.

- [3] Wang N, Zhou R, Wang C, et al. -251 T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis based on 42 case-control studies [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3): 2831-2841.
- [4] Howell WM, Rose-Zerilli MJ. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis [J]. J Nutr, 2007, 137(1 Suppl): 194s-199s.
- [5] Gerger A, Renner W, Langsenlehner T, et al. Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 119(3): 701-705.
- [6] 孙晓明,罗南萍. IL-8在不同肿瘤患者血清中的表达[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(3): 245-247.
- [7] 张晓雷,毛立群,葛新,等. 白细胞介素-8在肿瘤中的作用研究现状[J]. 武警后勤学院学报, 2014, 23(1): 69-72.
- [8] 赵晓亮,孙志君. IL-8与乳腺癌的研究进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(7): 817-818.
- [9] Farah H, Jayson W, Raida A, et al. The expression of IL-8 and IL-8 receptors in pancreatic adenocarcinomas and pancreatic neuroendocrine tumours [J]. Cytokine, 2010, 49(1): 134-140.
- [10] 王治伟,迟琼,万利. 乳腺癌患者血清IL-6、IL-8、IL-10和TNF- α 的水平变化及临床意义[J]. 广州医药, 2012, 43(3): 45-47.
- [11] 李美江. 白细胞介素基因多态性与乳腺癌遗传易感性的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(3): 373-374.

收稿日期:2014-06-02;修回日期:2014-06-10