

IL-10 基因内含子区基因多态性研究^①

黄孔文^{1,4}, 王海彦^{1,2}, 韦叶生³, 廖品琥^{1②}, 熊滨⁵, 李军¹, 黄冰⁴, 胡东海^{1,4}, 仇晓文^{1,4}

- (1. 右江民族医学院附属医院重症医学科, 广西 百色 533000 E-mail: 416437185@qq.com;
2. 广东省妇幼保健院麻醉科, 广东 广州 511400;
3. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西 百色 533000;
4. 广西医科大学肿瘤医院麻醉科, 广西 南宁 530021;
5. 广西壮族自治区人民医院重症医学科, 广西 南宁 530021)

摘要: 目的 比较研究白细胞介素 10 (IL-10) 基因内含子区单核苷酸多态性 (SNP) 基因型及等位基因在不同地区、种族人群之间的分布情况。**方法** 采用单碱基延伸 PCR 技术和 DNA 测序方法来检测广西人群 IL-10 基因内含子区 rs3021094T/G 多态性, 并与人类基因组计划研究的 4 个人群 (欧洲、非洲、中国北京、日本) 以及台湾地区人群 SNP 分型数据进行比较。**结果** rs3021094T/G 多态性分布的频率在广西人群男性、女性之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与日本、中国北京、台湾地区人群比较分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而与欧洲、非洲地区人群比较, 分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** IL-10 基因内含子区基因多态性在不同地区、种族人群之间的分布有差异。

关键词: 白细胞介素 10; 内含子; 多态性; 基因型

中图分类号: R394.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)06-0814-03
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.06.002

Genetic polymorphism of interleukin 10 gene intron region

Huang Kongwen^{1,4}, Wang Haiyan^{1,2}, Wei Yesheng³, Liao Pinhu¹,
Xiong Bin⁵, Li Jun¹, Huang Bin⁴, Hu Donghai^{1,4}, Qiu Xiaowen^{1,4}

- (1. Department of Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, 533000, Guangxi, China E-mail: 416437185@qq.com; 2. Department of Anesthesiology, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511400, Guangdong, China;
3. Department of Clinical Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, 533000, Guangxi, China; 4. Department of Anesthesiology, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;
5. Department of Intensive Care Unit, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous region, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the frequencies of genotype and allele distribution of interleukin 10 (IL-10) gene intron region single nucleotide polymorphism (SNP) in Guangxi population, and to analyze allelic and genotypic diversity of IL-10 gene among different regions and races. **Methods** The polymerase chain reaction-single base extension (PCR-SBE) and DNA sequencing were used to analyze the rs3021094T/G polymorphisms at the IL-10 gene intron region in Guangxi population. The diversity of genotypic and allelic rs3021094T/GT polymorphisms at the intron region of IL-10 in Guangxi population were compared with others (Hapmap-CEU, Hapmap-YRI, Hapmap-HCB, Hapmap-JPT) from the Human Genome Project group (Hapmap) data (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) as well as Taiwan of China. **Results** Compared the frequencies of rs3021094T/G polymorphisms between females and males in Guangxi population, there were no significant differences ($P > 0.05$). Compared the frequencies of rs3021094T/G polymorphisms of Guangxi population with HapMap-HCB, HapMap-JPT and Taiwan of China, there were no significant differences ($P > 0.05$). But compared the frequencies of rs3021094T/G polymorphisms of Guangxi population with HapMap-CEU, HapMap-YRI population, there were significant differences ($P < 0.05$).

① 基金项目: 广西自然科学基金重点项目(2011GXNSFD018039); 广西科技攻关项目(桂科攻 1140003B-93); 广西教育厅科研资助项目(201012MS176)

② 通讯作者, E-mail: liaopinhu@163.com

Conclusion The frequencies of polymorphisms distribution of IL-10 gene at intron region were significant differences among different regions and ethnic groups.

Key words: interleukin 10; intron; polymorphism; genotype

IL-10 是具有多效应功能的抗炎细胞因子,参与调节机体的免疫反应和炎症反应^[1-2]。可以通过抑制巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、T 细胞、肥大细胞等细胞的促炎细胞因子基因的表达,从而抑制促炎因子的合成和释放,调节机体的炎症反应与免疫反应平衡,维持机体内环境稳态^[3]。

IL-10 的基因位于 1 号染色体的长臂端,包含 5 个外显子和 4 个内含子^[4],其启动子区域的几个 SNP 位点与 IL-10 的表达水平密切相关^[5]。内含子碱基发生位点突变后,可能导致基因重组、外显子重复或者外显子再现,从而提高了特异功能结构域的剂量,这样可能影响蛋白质的活性及表达剂量^[6]。本研究通过对广西地区人群 IL-10 基因第二个内含子区的 rs3021094T/G 位点的研究,探讨其基因型和等位基因的频率分布,并与人类基因组计划研究的 4 个人群(欧洲、非洲、中国北京、日本)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)以及台湾地区人群 SNP 分型数据比较,以分析研究 IL-10 基因内含子区 SNP 分型在不同地区、种族人群之间的分布差异。

1 对象与方法

1.1 对象 在知情同意的基础上,选取 199 例广西地区中临床指标和实验室检查均在正常范围内的健康体检者,其中男 118 例,女 81 例,平均年龄为(54.0±14.61)岁。确认无器质性疾病,且无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 用 EDTA-K2 抗凝采血管收集每位参与者的外周静脉血 2 ml,使用改良碘化钠方法提取 DNA,在-70℃保存备用。

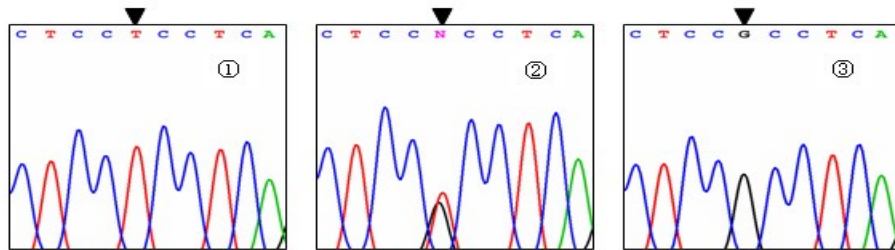
1.2.2 多态性位点基因型分析 采用单碱基延伸 PCR 分析方法检测 IL-10 基因第二个内含子区域 rs3021094T/G 的基因型。PCR 引物通过在线 Primer3 软件设计(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi),并由上海天昊生物科技有限公司合成。其中 rs3021094T/G 位点的上游引物序列为:5'-AAATTGGCTCTGGCCCAAAAAA-3',下游:5'-GGAAGCACTCTACATGAGGGAAACCT-3',扩增片段长度 350bp,延伸引物序列是:5'-TTTGGACCATCACTTAAATCAGGTCCTCC-3'。

1.2.3 PCR 反应 采用 20 μl 扩增反应体系,其中包含 1xHotStarTaq 缓冲液、多重 PCR 引物、HotStarTaq 聚合酶(Qiagen Inc.)、3.0 mmol/L 镁离子、0.3 mmol/L dNTP、DNA 模板。反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 15 s,65~0.5℃退火 40 s,72℃延伸 1 min 的顺序重复 11 个循环;然后以 94℃变性 15 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 的顺序重复 24 个循环;72℃延伸 2 min。PCR 产物用虾碱酶(Promega)和外切酶 I(Epicentre)纯化后进行延伸反应(SNaPshot Multiplex kit,ABI),延伸产物纯化后用 ABI3130XL 测序仪进行测序,测序结果用 GeneMapper 4.1(Applied biosystems)进行分型分析(由上海天昊生物科技有限公司承做)。

1.3 统计学方法 研究结果用 SSPS 13.0 软件进行统计学分析,组间基因型及等位基因的分别情况、计数资料的比较均采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型检测结果 本研究采用单碱基延伸 PCR 技术对 IL-10 基因内含子区 rs3021094T/G 位点进行多态性分析,SNP 分型结果发现 rs3021094T/G 位点存在 TT、GT、GG 三种基因型。并通过基因测序验证了此结果,见图 1。



注:①、②、③分别为 TT、GT、GG 基因型,基因突变位点用箭头表示

图 1 IL-10 基因 rs3021094T/G 位点测序图

2.2 SNP 分型结果 通过分析 IL-10 基因第二个内含子区 rs3021094T/G 位点 SNP 分型数据,经 χ^2 检验,IL-10 基因第二个内含子区 rs3021094T/G 位点基因型及等位基因的频率在男性、女性两组之间分布差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1,符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,具有人群代表性。其中,rs3021094T/G 位点以 GT 基因型多见,占 51.76%,以 G 等位基因较为常见,占 53.52%。

2.3 不同地区、种族人群间的比较 通过对广西地区人群与人类基因组计划研究的 4 个人群(欧洲、非洲、中国北京、日本)及台湾^[7]地区人群 SNP 分型数据的比较,结果发现 IL-10 基因内含子区 rs3021094T/G 位点的基因型及等位基因频率分布与欧洲、非洲地区人群相比差异有统计学意义($P < 0.05$),而

与日本、中国北京、台湾地区人群分布相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 1 IL-10 基因 rs3021094T/G 位点在广西地区人群中的分布情况 (n,%)

组别	n	基因型			等位基因	
		TT	GT	GG	T	G
男性	118	24(20.34)	57(48.31)	37(31.36)	105(44.49)	131(55.51)
女性	81	17(20.99)	46(56.79)	18(22.22)	80(49.38)	82(50.62)
合计	199	41(20.60)	103(51.76)	55(27.64)	185(46.48)	213(53.52)

注:P 均>0.05

表 2 IL-10 基因 rs3021094T/G 位点多态性在不同地区、种族人群的分布情况 (n, %)

种族	n	基因型			等位基因	
		GG	GT	TT	G	T
欧洲人群	120	0(0.00)	16(13.33)	104(86.67)	16(6.67)	224(93.33)
非洲人群	120	0(0.00)	0(0.00)	120(100.00)	0(0.00)	240(100.00)
日本人群	90	18(20.00)	48(53.33)	24(26.67)	84(46.67)	96(53.33)
北京人群	90	22(24.44)	50(55.56)	18(20.00)	94(52.22)	86(47.78)
台湾人群	252	68(26.98)	122(48.41)	62(24.60)	258(51.19)	246(48.81)
广西人群	199	55(27.64)	103(51.76)	41(20.60)	213(53.52)	185(46.48)

注: P 均 < 0.05

3 讨论

IL-10 基因表达受到严格调控, IL-10 基因定位于第 1 号染色体 q31~32, 包括 5 个外显子和 4 个内含子^[4], 在细胞和血浆中 IL-10 水平很低, 而当机体受到外界刺激或者患有某些疾病后, 其表达水平将大大增加, 参与机体的免疫调节和抗炎反应。炎症反应中, IL-10 可能起到重要的反馈作用, 以控制机体避免发生瀑布样炎症反应。IL-10 的免疫抑制作用, 使其对部分抗原具有免疫耐受作用, 在病原体清除中起作用, 如果 IL-10 水平过高或者功能紊乱, 都会导致慢性炎症的形成^[8]。

目前对 IL-10 多态性的研究主要集中在启动子区的 -1082(G/A)、-819(C/T)、-592(C/A), 其他大部分主要位于非编码区的内含子^[9]。国内外研究显示, IL-10 基因多态性影响 IL-10 的自身产生, 与多种疾病相关。IL-10 的 -819(C/T) 与强直性脊柱炎呈显著相关性趋势 (P = 0.054)^[10]; IL-10 基因启动子 -592(C/A) 多态性对血脂异常有一定影响^[11]; IL-10 1082(A/G) 基因多态性与脓毒症易感性有关^[12]。

内含子主要通过选择剪接使单一基因产生多种蛋白质, 在不同的水平影响基因表达, 其中包括影响转录、mRNA 输出及翻译效率等^[13]。rs3021094T/G 位点位于 IL-10 基因的第二个内含子区, 其基因多态性可能在基因的表达中起着重要的调节作用^[14], 可能影响 IL-10 基因的功能, 而 IL-10 基因功能的变化可能与某些疾病发病情况有关, 使不同地区、种族的人群对疾病的易感性及发病率不同。

通过对比分析 IL-10 第二个内含子区 rs3021094T/G 位点多态性分布情况, 结果发现 rs3021094T/G 位点以 GT 基因型 (51.76%) 较为多见, rs3021094T/G 位点的等位基因 (G、T) 在本研究人群中分布比较接近。rs3021094T/G 位点基因型及等位基因的分布频率在男性、女性间分布差异无统计学意义 (P > 0.05)。本研究人群的 rs3021094T/G 位点基因型及等位基因的分布频率与欧洲、非洲地区人群的 T、G 等位基因分布频率比较接近; 而欧洲、非洲地区人群中在 rs3021094T/G 位点以 TT 基因型 (各占 86.67% 和 100%) 最为常见, 以 T 等位基因最为常见 (各占 93.33% 和 100%), 差异有统计学意义 (P < 0.05); 而与日本、中国北京、台湾地区人群的分布差异无统计学意义 (P > 0.05)。研究结果提示, IL-10 基因内含子区 SNP 分型在不同地区及种族之间存在差异, 这种差异可能与自然环境、生活环境以及种族的差异有关。

4 结论

IL-10 基因内含子区基因多态性在不同地区、种族人群之

间的分布有差异。

参考文献:

- [1] Zeng L, Gu W, Chen K, et al. Clinical relevance of the interleukin 10 promoter polymorphisms in Chinese Han patients with major trauma: genetic association studies [J]. Crit Care, 2009, 13(6): R188.
- [2] Barbisan G, Perez LO, Contreras A, et al. TNF- α and IL-10 promoter polymorphisms, HPV infection, and cervical cancer risk [J]. Tumour Biol, 2012, 33(5): 1549-1556.
- [3] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor [J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683-765.
- [4] Kingo K, Rätsep R, Kõks S, et al. Influence of genetic polymorphisms on interleukin-10 mRNA expression and psoriasis susceptibility [J]. Dermatol Sci, 2005, 37(2): 111-113.
- [5] Gaddam SL, Priya VH, Babu BM, et al. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in allergic patients [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(6): 632-635.
- [6] RM. 特怀曼. 高级分子生物学要义 [M]. 陈淳, 译. 北京: 科学出版社, 2003: 86-87.
- [7] Lu MY, Lakkakula BV, Liao YC, et al. Lack of association between the IL-10 gene polymorphisms and features of the metabolic syndrome [J]. Investig Med, 2011, 59(2): 267-271.
- [8] O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease [J]. Immunol Rev, 2008, 223: 114-131.
- [9] 詹茜. 白细胞介素-10 基因多态性和自身免疫性疾病的相关性研究 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(16): 2173-2175.
- [10] Lee WY, Chang YH, Lo MK, et al. Polymorphisms of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and cytokine genes in Taiwanese patients with ankylosing spondylitis [J]. Tissue Antigens, 2010, 75(2): 119-126.
- [11] 唐小平, 万沁, 陈枫, 等. IL-10 基因启动子 -592(C/A) 多态性与血脂异常的关系 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(1): 37-40.
- [12] Lin Ouyang, You-Di Lv, Can Hou, et al. Quantitative analysis of the association between interleukin-101082A/G polymorphism and susceptibility to sepsis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(7): 4327-4332.
- [13] 靳霞吕, 占军. 内含子的进化及基因表达调节 [J]. 生命的化学, 2008, 28(1): 33-35.
- [14] Shen J, Deininger PL, Zhao H. Applications of computational algorithm tools to identify functional SNPs in cytokine genes [J]. Cytokine, 2006, 35(1-2): 62-66.

收稿日期: 2014-10-11; 修回日期: 2014-10-20