文章编号:1000-5404(2010)06-0525-04

论著

IL-17多态性与慢性萎缩性胃炎的相关性研究

罗 媛[1],郭 红[2],边 巍[3],梁光萍[4],邹全明[1],郭 刚[1] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系临床微生物及免疫学教研室[1],400037 重庆,新桥医院消化内科[2],400038 重庆,西南医院全军烧伤研究所,创伤、伤与复合伤国家重点实验室[4];050081 石家庄,白求恩军医学院训练部临床管理科[3])

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素-17A,-17F(IL-17A,-17F)基因多态性与慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)的相关性。**方法** 采用病例-对照研究方法,收集经组织学确诊的慢性萎缩性胃炎患者129例和健康对照人群223例,收集外周血标本,提取DNA,运用*Taq* Man MGB探针方法进行多态性检测。同时所有样本经组织快速尿素酶检测(RUT)和血清酶联免疫吸附法(ELISA)抗*Hp*-IgG抗体检测,以测定人群幽门螺杆菌(*Helicobater pylori*, *Hp*)感染率。**结果** IL-17A(rs2275913,G-197A)、IL-17F(rs76378,7488T/C)位点的基因型和等位分布在慢性萎缩性胃炎组和健康献血员正常对照组中差异均无统计学意义($P>0.05$)。IL-17F(rs766748,6400A/G)在慢性萎缩性胃炎组中的等位频率显著高于正常对照组($P=0.004$)。与未携带有IL-17F 6400A/G A等位的个体相比,携带有IL-17F 6400A/G A等位的个体显著的增加了慢性萎缩性胃炎的易感性。经非条件Logistic回归校正年龄、性别、*Hp*感染等因素后,在显性模式下,IL-17F 6400A/G SNP位点与慢性萎缩性胃炎仍显著相关(显性模式:$OR=2.271$, 95% $CI=1.259-4.095$, $P=0.006$)。在伴有*Hp*感染的所有群体中进行比较,IL-17A,-17F各位点基因型未见明显差异。**结论** IL-17F 6400A/G基因多态性与慢性萎缩性胃炎的发生风险显著相关。

[关键词] 幽门螺杆菌;慢性萎缩性胃炎;白细胞介素-17;基因多态性
[中图法分类号] R392.11;R394.5;R573.32 **[文献标志码]** A

IL-17 polymorphism is associated with chronic atrophic gastritis

Luo Yuan[1], Guo Hong[2], Bian Wei[3], Liang Guangping[4], Zou Quanming[1], Guo Gang[1] ([1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Laboratory Medicine, [4]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [3]Department of Clinical Administration, Division of Educational Affairs, Bethune Military Medical College, Shijiazhuang, Hebei Province, 050081, China)

[Abstract] **Objective** To determine the possible association of the 3 polymorphisms, IL-17A rs2275913 G-197A, IL-17F rs763780 7488T/C and IL-17F rs766748 6400A/G) in the IL-17 gene with the susceptibility to gastroenteric disease caused by *H. pylori* in Chinese population. **Methods** A hospital-based case-control study was conducted, and 223 unrelated healthy blood donors and 129 chronic atrophic gastritis (CAG) patients were recruited from Chongqing. Three polymorphisms were genotyped by TaqMan-MGB-PCR analysis. The associations with the susceptibility to CAG disease were estimated by Logistic regression. The infection of *H. pylori* level were evaluated by the level of serum anti-*Hp*-IgG antibody by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the urease of gastric mucosa detected with rapid urease testing (RUT). **Results** There was no significant difference in allele frequencies or genotype distributions of IL-17A G-197A and IL-17F 7488T/C between blood donors and CAG patients ($P>0.05$). However, the IL-17F 6400A/G allele frequencies were significantly higher in CAG patients than those in blood donors ($P=0.004$). Subjects bearing at least one IL-17F 6400A/G A alleles had an increased susceptibility to CAG diseases compared with those without IL-17F 6400A/G A alleles (Dominant model, $P=0.006$, $OR=2.271$, 95% CI: 1.259 – 4.095). There was no significant difference in allele frequencies or genotype distributions of three polymorphisms in the

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB522600)
[通信作者] 郭 刚,电话:(023)68752315, E-mail: guogang7001@163.com

IL-17A and IL-17F gene between the all subjective with *H. pylori* infection or without. **Conclusion** Our results suggest that the genetic variation at the IL-17F locus affects the susceptibility to CAG in Chinese population and emphasizes the importance of IL-17 in the pathophysiology of gastroenteric disease.

[Key words] *Helicobacter pylori*; chronic atrophic gastritis; IL-17; genetic polymorphisms

Supported by the National Basic Research Program of china (973 Program, 2009CB522600). Corresponding author: Guo Gang, Tel: 86-23-68752315, E-mail: guogang7001@163.com

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *Hp*)是一种专性寄生于人胃的微需氧革兰阴性螺杆菌。*Hp* 是慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡的主要致病因子,并与胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生密切相关。与 *Hp* 相关的胃十二指肠疾病主要是由于宿主对感染的不适当胃免疫反应所致,免疫与炎症之间的相互作用及胃生理和宿主的修复机制决定了对感染的不同临床表现,而细胞因子始终参与这一过程。

IL-17 家族是最近发现的一类与适应性及固有性免疫应答相关的细胞因子,不同于 Th1、Th2 种类的一群细胞因子,通过释放促炎症和嗜中性粒细胞细胞因子在局部组织炎症中扮演重要角色。IL-17 家族至少存在有 6 个家族成员(IL-17A-F)和 5 个受体(IL-17RA-RD 和 SEF)。Luzza 等[1]研究发现 IL-17 mRNA 的翻译和蛋白水平在 *Hp* 感染者较非感染者明显增高。这些结果提示我们 IL-17 参与了 *Hp* 定植的胃部疾病的发生、发展。此外,大量研究证实 IL-17 基因多态性也与疾病的发展密切相关,但是有关 IL-17 多态性和慢性萎缩性胃炎相关性的研究尚少有报道。本研究拟对健康人群和慢性萎缩性胃炎患者 IL-17 基因多态性进行检测,探讨其相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象及临床资料

129 例慢性萎缩性胃炎患者均来自第三军医大学新桥医院消化内科,其中男性 55 例,女性 74 例,平均年龄 53.5 岁。223 例健康对照者来自第三军医大学新桥医院消化内科,其中男性 105 例,女性 118 例,平均年龄 46.6 岁。以上研究个体均经临床、胃镜和病理诊断证实,并且均为无血缘关系的重庆汉族人,既往无糖尿病、系统性红斑狼疮、关节炎、炎症性肠病等自身免疫性疾病史。

1.2 基因组 DNA 制备

所有研究对象抽取外周静脉血 2 ~ 3 ml,置于 EDTA 抗凝管中,取 200 μl 血浆用于检测 *Hp* 抗体,采用 Promega(USA)抽提基因组 DNA 试剂盒。抽提后的 DNA 测 $D(260)/D(280)$ 值及 1% Agarose 电泳检测 DNA 纯度、含量及分子完整性。标本于 -60 ℃冰箱保存。

1.3 *Hp* 检测

所有研究对象在进行胃镜检查时均取胃黏膜组织一块用来进行快速尿素酶检测。同时使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 *Hp*-IgG 抗体。ELISA 试剂盒由北京贝尔公司生产。*Hp* 感染诊断标准:所有标本经 2 种方法检测 *Hp*,2 种方法同为阳性则 *Hp* 为阳性,同为阴性则为 *Hp* 阴性,一阳一阴者剔除。最后测出患者组 *Hp* 感染 67 例,健康对照组 *Hp* 感染 79 例。

1.4 主要仪器和试剂

美国应用生物系统公司(ABI)7500 实时定量 PCR 仪由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所提供,美国应用生物系统公司(ABI) *Taq* Man GTXpress Master Mix(货号 4403089),美国应用生物系统公司(ABI) *Taq* Man SNP Genotyping Assays(货号 4367302),TE(三·乙二胺四乙酸)缓冲液,Genuine Axygen 带帽试管,枪头。

1.5 *Taq* Man MGB 探针检测基因多态性

采用 *Taq* Man MGB 探针法对上述 SNP 位点进行分型,引物和 *Taq* Man MGB 探针由美国应用生物系统公司(ABI)设计(货号 4367302),分别由荧光素 FIM 和 VIC 标记。荧光素 FIM 检测 Y 等位基因,荧光素 VIC 检测 X 等位基因。每份基因组 DNA 样本终浓度稀释到 50 ng/μl,PCR 反应体系为 10 μl:包括基因组 DNA 样本 2 μl, *Taq* Man SNP Genotyping Assays 0.25 μl, *Taq* Man GTXpress Master Mix 5.0 μl,去离子水 2.75 μl。PCR 反应在美国应用生物系统公司(ABI)7500 实时定量 PCR 仪上进行,按 7500 用户手册操作。反应条件为:95 ℃ 20 s, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s,40 个循环。实验中设阴性对照和阳性对照,并采用单纯随机抽样法对其中 50 例样本进行重复基因型检测,结果一致。

采用终点读板分析法读取 PCR 扩增产生的荧光素,基因型分析在美国应用生物系统公司(ABI)7500 实时定量 PCR 仪上进行,采用 SDS(Sequence Detection System)软件(美国应用生物系统公司 ABI)分析。野生型等位基因和突变体等位基因结果通过二维散点图区分。

1.6 统计学方法

用直接计数法计算 IL-17A、F 各位点的基因型频率。数据处理使用 SPSS 13.0 软件进行分析,两样本分布经过 Hardy-Weinberg 平衡检验,慢性萎缩性胃炎组与健康对照组的基因型及等位基因频率分布差异用 χ^2 检验分析,多态性位点在慢性萎缩性胃炎发病中的风险度以非条件 Logistic 回归分析所得的相对风险度(odds ratios, *OR*)以及 95% 可信区间(confidence intervals, *CI*)表示。

2 结果

2.1 临床人口学资料

在 129 例慢性萎缩性胃炎患者组中,*Hp* 阳性 67 例,感染率

表1 病例对照人群的社会人口学和临床资料

组别	n	性别[例(%)]		中位年龄[岁,($\bar{x}\pm s$)]	吸烟者[例,(%)]	饮酒者[例,(%)]	*Hp* 感染率[例,(%)]
		男性	女性				
胃炎组	129	55(42.6)	74(57.4)	53.5±13.5	25(19.3)	20(15.5)	67(51.9)
对照组	223	105 (47.1)	118 (52.9)	46.6±10.2	51(22.9)	43(19.3)	79(35.4)

"吸烟者"为既往或目前每天吸烟1支以上;"饮酒者"为男性每周饮白酒≥40 g/周或女性男性每周饮白酒≥20 g/周

表2 IL-17基因多态性在慢性萎缩性胃炎组和健康对照组基因型频率分布[例数(%)]

组别	n	G-197A					7488T/C					6400A/G				
		A/A	A/G	G/G	A等位基因	G等位基因	T/T	T/C	C/C	T等位基因	C等位基因	A/A	A/G	G/G	A等位基因	G等位基因
胃炎组	129	22(17.1)	75(58.1)	32(24.8)	119(46.1)	139(53.9)	93(72.1)	30(23.3)	6(4.6)	216(83.7)	42(16.3)	32(24.8)	67(52.0)	30(23.2)	131(50.7)	127(49.2)
对照组	223	43(19.3)	125(56.1)	55(24.7)	211(47.3)	235(52.7)	170(76.2)	50(22.4)	3(1.3)	390(87.4)	56(12.6)	30(13.5)	117(52.4)	76(34.1)	177(40.0)	269(60.3)

为51.9%。223例健康对照者组中,*Hp* 阳性79例,感染率为35.4%。慢性萎缩性胃炎患者 *Hp* 感染率明显高于对照组($P=0.002$)。性别、吸烟及饮酒2组比较差异无统计学意义($P=0.419$,$P=0.443$,$P=0.373$)。结果见表1。

2.2 慢性萎缩性胃炎组和健康对照组IL-17A、F各基因型频率分布及比较

IL-17A(rs2275913 G-197A)、IL-17F(rs763780 7488T/C)位点的基因型和等位分布在慢性萎缩性胃炎组和健康对照组中差异均无统计学意义($P>0.05$)。但IL-17F(rs766748 6400A/G)在慢性萎缩性胃炎组中的等位频率显著高于健康对照组($P=0.004$)。结果见表2。

2.3 IL-17F 6400A/G多态性与CAG的非条件Logisitic回归关联分析

对IL-17F 6400A/G位点进行非条件Logistic回归校正年龄、性别等因素对结果的影响。在显性模式下,IL-17F 6400A/G与慢性萎缩性胃炎发生率显著相关(显性模式:$OR=2.271$,95% $CI=1.259-4.095$,$P=0.006$)。与携带6400A/G GG或AG基因个体相比,携带有AA基因型的个体对慢性萎缩性胃炎易感性显著升高。结果见表3。

表3 IL-17F 6400A/G多态性与CAG的非条件Logisitic回归关联分析

组别	n	A/A	A/G	G/G	A等位基因	G等位基因
胃炎组	129	32(24.8)	67(52.0)	30(23.2)	131(50.7)	127(49.2)
对照组	223	30(13.5)	117(52.4)	76(34.1)	177(40.0)	269(60.3)

3 讨论

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis,CAG)是胃癌发生过程中一个重要阶段,是导致全世界胃癌死亡的第2个重要因素。*H. pylori* 感染被认为是慢性萎缩性胃炎的一个主要致病因素。在大部分人群中,*Hp* 感染首先引起嗜中性的胃炎,进一步发展为慢性活动性胃炎。持续性炎症可能加剧了炎症性细胞因子的串联反应,以及T、B细胞免疫应答,最后导致了胃萎缩、肠化生及胃癌的发生。但是,*Hp* 感染率在不同人群中不同,并且感染 *Hp* 后也并非全部发病,且表现的疾病类型及临床结局也有不同。流行病研究认为可能与宿主基因多态性及 *Hp* 菌株的毒力高低、环境等因素有关。

宿主基因因素是许多癌症发生的危险因素,IL-17是一类新发现的促炎性细胞因子,主要由活化的T细胞分泌[2]。在这个细胞因子家族里,IL-17A与IL-17F有高度的同源性,包括大约50%的氨基酸同源性、相同的染色体位置,且二者都由活化的T细胞表达。IL-17在诱导活化巨噬细胞、成纤维细胞及内皮细胞的过程中扮演重要角色,并刺激这些效应细胞释放各种介素如IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α、及刺激粒细胞的生成。在T细胞中,Th1\Th0细胞亚群是IL-17的主要来源,众所周知,Th1在 *Hp* 感染的局部免疫应答反应中起主导作用。有研究证明在Th1介导的疾病中发现IL-17显著增加,Luzza等[1]研究发现IL-17 mRNA的翻译和蛋白水平在 *Hp* 感染组中较非感染组中明显增高。此外,Mizuno等[3]观察到IL-17和IL-8在 *Hp* 阳性患者的活检标本和器官培养中,相比 *Hp* 阴性患者IL-17和IL-8是显著增高的。在 *Hp* 感染的胃溃疡患者中,溃疡胃黏膜组织的IL-17和IL-8表达水平显著高于非溃疡黏膜。以上研究都提示IL-17可能在 *Hp* 感染的胃病及胃部炎症反应的发病机制中发挥重要作用。但是IL-17A和IL-17F在慢性胃炎发病机制中的作用尚不清楚,因此我们认为这些细胞因子也许会影响慢性胃炎的发展,并对这两种细胞因子多态性在慢性萎缩性胃炎发病机制中的作用进行了研究。

Shibata等[4]对IL-17A(rs2275913, G-197A)和IL-17F(rs763780, 7488 T/C)的多态性进行分析,发现IL-17A\-197A和胃癌的发展显著相关,特别是肠型

胃癌,但 IL-17F(rs763780, 7488 T/C)和胃癌的发生并无关联。Nordang 等[5]对挪威和新西兰的高加索人进行研究,发现 IL-17A 的 5 个 SNP 多态性与风湿性关节炎的发展没有显著相关性。Ramsey 等[6]检测了 IL-17 的 50 个 SNP 位点,结果均未提示任何基因型或单倍型与哮喘相关。相反,Kawaguchi 等[7]通过重组野生型和突变体 IL-17F 蛋白,对 IL-17F \ rs763780 (His161Arg)碱基置换做了功能分析。并指出 IL-17F 的突变体 rs763780 (His161Arg)在日本人哮喘发展过程中起保护对抗作用[8]。Arisawa 等[9]发现在日本人群中 G-197A (IL-17A) and 7488T/C (IL-17F)多态性影响了溃疡性结肠炎的易感性。Arisawa 等[10]发现 7488T/C (IL-17F)和 MIF-173C 在日本人群中与 FD (功能性消化不良)的发展显著关联,特别是 7488T/C (IL-17F)的多态性与 EPS(上消化道疼痛综合征)中 *Hp* 感染患者显著相关。在我们的研究中采用 *Taq* Man MGB 探针法对 IL-17A G-197A、IL-17F 7488T/C、IL-17F 6400A/G 的 SNP 位点进行了分析,*Taq* Man MGB 探针(minorgroove binder oligodeoxynucleotide onjugate, GB-ODN)相比普通 *Taq* Man 探针具有以下优点:①在 3'端采用了非荧光性的淬灭基因,淬灭基团吸收报告基团的能量后并不发光,大大降低了本底信号的干扰。②探针 3'端 MGB 小沟结合物提高了探针的退火温度,因此可以设计更短的探针,探针缩短的同时,提高了探针的灵敏度,可以达到识别一个碱基差异的程度。*Taq* Man MGB 探针由于可以识别单个碱基变异而具有高度特异性,以及重复性好、灵敏度高等优点被广泛运用,被认为是继基因测序后又一检测基因多态性的金标准。目前,国内外尚少有 IL-17F 6400A/G 位点的相关报道,我们发现 IL-17F 6400A/G 在慢性萎缩性胃炎组中的等位频率显著高于健康对照组($P=0.004$)。与未携带 IL-17F 6400A/G A 等位的个体相比,携带 IL-17F 6400A/G A 等位基因的体对慢性胃炎的易感性增加。结果提示 IL-17F 6400A/G A 等位为慢性萎缩性胃炎的易感基因,而 IL-17F 6400A/G G 等位为慢性萎缩性胃炎的保护基因。IL-17A G-197A 和 IL-17F 7488T/C 位点的基因型和等位分布在慢性萎缩性胃炎组和健康对照组中均无明显差异($P>0.05$)。同时在我们的研究中,对伴有 *Hp* 感染的所有群体中进行比较, IL-17A,-17F 各位点基因型未见明显差异。

IL-17 多态性在不同疾病、不同人群中结果存在差异性,提示我们种族差异性,样本量差异性及疾病种类差异性是否会对结果产生影响。另外,这些差异是否归咎于胃部疾病的多重特性,基因因素也许只是在疾病特定的阶段发挥,对于一些非基因因素,例如饮食、饮酒、心理压力等,也会在疾病的发展过程中起到作用。目前国内外对于 IL-17 多态性研究很少,IL-17 在 *Hp* 感染胃病的功能也尚未明确。我们的研究存在样本量不够大、功能不明确等局限性,并且宿主基因因素是一个综合作用的结果,这些功能和综合作用都需要做更进一步研究。

参考文献:

[1] Luzza F, Parrello T, Monteleone G, *et al*. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa[J]. J Immunol, 2000, 165(9): 5332-5337.

[2] Harrington L E, Hatton R D, Mangan P R, *et al*. Interleukin 17-producing CD4$^+$ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.

[3] Mizuno T, Ando T, Nobata K, *et al*. Interleukin-17 levels in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(40): 6305-6311.

[4] Shibata T, Tahara T, Hirata I, *et al*. Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis[J]. Hum Immunol, 2009, 70(7): 547-551.

[5] Nordang G B, Viken M K, Hollis-Moffatt J E, *et al*. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(4): 367-370.

[6] Ramsey C D, Lazarus R, Camargo C A Jr, *et al*. Polymorphisms in the interleukin 17F gene (IL-17F) and asthma[J]. Genes Immun, 2005, 6(3): 236-241.

[7] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, *et al*. IL-17 cytokine family[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114(6): 1265-1274.

[8] Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, *et al*. IL-17F sequence variant(His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(4): 795-801.

[9] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, *et al*. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis[J]. J Clin Immunol, 2008, 28(1): 44-49.

[10] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, *et al*. Genetic polymorphisms of molecules associated with inflammation and immune response in Japanese subjects with functional dyspepsia[J]. Int J Mol Med, 2007, 20(5): 717-723.

(**收稿**:2009-11-01;**修回**:2009-11-12)

(编辑 张 维)