

# 白介素-10、干扰素- $\gamma$ 基因多态性与肺结核病易感性的关系

杨慧 梁肇海 刘小立 王峰

**【摘要】** 目的 探讨白介素-10(IL-10)基因-1082G/A位点和干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )基因+874A/T位点单核苷酸多态性(SNP)与肺结核病易感性的关系。方法 采用序列特异性引物PCR(PCR-SSP)及测序技术检测深圳地区汉族人群肺结核病例组及对照组各200例IL-10启动子区-1082G/A、IFN- $\gamma$ +874A/T位点基因多态性。结果 病例组IL-10(-1082)位点A/A纯合子、A/G杂合子、G/G纯合子基因型频率分别为85.4%、13.1%、1.5%,对照组分别为77.5%、22.0%、0.5%;病例组A、G等位基因频率分别为91.9%、8.1%,对照组分别为88.5%、11.5%。两组间基因型分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。病例组A/A基因型高于对照组,G/A基因型低于对照组( $P < 0.05$ )。但两组的A、G等位基因频率分布差异没有统计学意义。IFN- $\gamma$ (+874)位点基因型频率及等位基因频率在病例组和对照组中分布无明显差异( $P > 0.05$ )。结论 中国汉族人群中细胞因子IL-10(-1082)基因SNP与肺结核易感性相关。A/A基因型可能是一个肺结核易感的风险因素。细胞因子IFN- $\gamma$ (+874)基因位点SNP与肺结核易感性无关。

**【关键词】** 肺结核病; 白细胞介素-10; 干扰素- $\gamma$ ; 基因多态性

**Association between polymorphisms of interleukin-10, interferon- $\gamma$  gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis** YANG Hui<sup>1</sup>, LIANG Zhao-hai<sup>2</sup>, LIU Xiao-li<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>1</sup>. 1 Shenzhen Center for Chronic Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China; 2 Futian Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: YANG Hui, Email: yh2009cn@yahoo.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the association of IL-10, IFN- $\gamma$  gene polymorphisms at position -1082G/A and +874A/T and susceptibility to pulmonary tuberculosis (PTB) through a case-control study. **Methods** Polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP)/sequencing method, single nucleotide polymorphisms (SNP) of IL-10 and IFN- $\gamma$  gene at position -1082 and +874 were used on pulmonary tuberculosis patients (group PTB) and normal healthy subjects (group NHS) in the Han population from Shenzhen city of China. **Results** The genotype frequencies of A/A homozygotes, A/G heterozygous and G/G homozygous at -1082 site of IL-10 gene in patients with pulmonary tuberculosis were 85.4%, 13.1%, 1.5% respectively and A, G allele frequencies were 91.9%, 8.1% respectively. In healthy subjects, the genotype frequencies of A/A homozygotes, A/G heterozygous and G/G homozygous were 77.5%, 22.0%, 0.5% respectively and A, G allele frequencies were 88.5%, 11.5% respectively. Genotype distribution between the two groups was significantly different ( $P < 0.05$ ). The genotype frequencies of A/A of IL-10 in the patient group were higher than that of control group. In contrast, the genotype frequencies of G/A in the control group were higher than that in the patient group ( $P < 0.05$ ). There was no statistical difference found between A and G allele ( $P > 0.05$ ). For IFN- $\gamma$  (+874) and no significant difference was found on the distribution of genotypes or alleles between the two groups. **Conclusion** The IL-10 (-1082) gene SNP might be associated with the susceptibility to tuberculosis. A/A genotype might be a risk factor for the susceptibility on tuberculosis while the SNP of cytokines (+874) might not be associated with the susceptibility to tuberculosis in Chinese Han populations.

**【Key words】** Pulmonary tuberculosis; Interleukin-10; Interferon- $\gamma$ ; Gene polymorphism

白介素-10(IL-10)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )基因多态

性与肺结核病易感性的关系在不同国家、地区的不同种族人群中研究结果不一致。本文通过病例对照研究,采用序列特异性引物PCR及测序技术检测IL-10基因启动子区-1082G/A位点、IFN- $\gamma$ 基因+874A/T位点单核苷酸多态性(SNP),探讨在中

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.02.009

作者单位: 518020 深圳市慢性病防治中心(杨慧、刘小立、王峰); 深圳市福田区疾病预防控制中心(梁肇海)

通信作者: 杨慧, Email: yh2009cn@yahoo.com.cn

国汉族人群中 IL-10、IFN- $\gamma$  基因多态性与肺结核病的关系。

### 对象与方法

1. 对象: 病例组为 200 例肺结核病患者, 来源于深圳市慢性病防治中心, 经 X 线检查、痰结核菌涂片及培养检查结合临床症状确诊为结核病患者, 均符合中华人民共和国卫生行业标准 WS 288—2008 肺结核诊断标准。其中男性 112 例, 女性 88 例, 平均年龄 (33.1  $\pm$  10.7) 岁。健康对照组为 200 名体检健康者 (血液标本由深圳市第二人民医院提供), 男性 114 名, 女性 86 名, 平均年龄 (31.7  $\pm$  9.4) 岁。两组对象均为深圳地区汉族人, 无亲缘关系, 一般资料具有可比性。

#### 2. 方法:

(1) 基因组 DNA 提取: 采集受检者静脉血 2 ml, 用 EDTA-K2 抗凝。采用北京天根公司 DNA 提取试剂盒提取外周血基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液, -20  $^{\circ}$ C 保存。

(2) 序列特异性引物聚合酶链反应 (PCR-SSP): 参照参考文献 [1, 2] 方法设计引物 (表 1)。

表 1 PCR-SSP 分析 2 基因位点 SNP 的引物及扩增产物长度

位点	引物 (5' ~ 3')	位置 (bp)
IL-10(-1082 G/A)		
Specific F1	CTAAGGCTTCTTTGGGAA	2563
Specific F2	CTAAGGCTTCTTTGGGAG	
Common R	CAGGTAATACTGGATCATCT	
IFN- $\gamma$ (+874 A/T)		
Specific F1	TTACAACACAAAATCAAATCT	1414
Specific F2	TTACAACACAAAATCAAATCA	
Common R	TCATTCTCATTTCTATTCTTT	
对照		
Control F	AGAAAAAATGGCTAAGAAAT	996
Control R	AATGCACTGGGAGACAAT	

(3) 电泳及基因型判定: 每份样本的 PCR 扩增产物 (2 管), 分别加入到含有 Goldview 核酸染料的 1.5 % 琼脂糖凝胶中, 1  $\times$  TAE 缓冲液, 80 V 恒压电泳 30 min, 凝胶成像仪下观察结果并拍照。每次扩增以出现内参照 (996 bp) 阳性条带判定为扩增有效, 根据每份样本的 PCR 扩增产物 (2 管) 的电泳图象判断结果, 当只有加 1 型特异性正向引物管的产物出现目的条带时判定为 1/1 纯合子, 当只有加 2 型特异性正向引物管的产物出现目的条带时判定为 2/2 纯合子, 当 2 管产物都出现目的条带时判定为 1/2 杂合子。

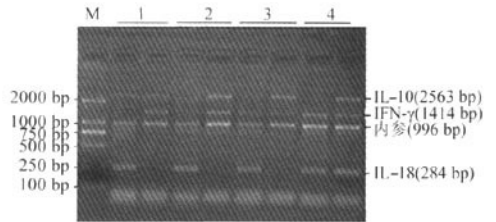
(4) 质量控制: 分别选取 -1082G/A G/G、G/A、A/A,

+874A/T T/T、T/A、A/A 基因型标本用内参照引物进行的 PCR 扩增产物各 1 份, 进行测序分析, 经测序证实后, 作为质控品, 加入到每批标本中进行 PCR 扩增, 以保证 PCR 扩增结果准确。

3. 统计学分析: 基因型和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律后, 各基因型及等位基因频率比较采用  $\chi^2$  检验。

### 结 果

1. PCR-SSP 及测序: 对于 -1082G/A 位点及 +874A/T 位点, 2 条特异性正向引物和通用的反向引物分别扩增 2563 bp 和 1414 bp 的产物, 内参正向引物和通用的反向引物扩增 996 bp 的产物 (图 1)。各种基因型的内参引物的扩增产物进行测序分别测出野生型和突变型纯合子和杂合子, 与 PCR-SSP 方法结果一致 (图 2), 说明该方法可以用于基因分型。



注: 1: G/A、A/A; 2: A/A、A/A; 3: A/A、T/A; 4: A/A、T/A; M: DL2000 DNA Marker

图 1 IL-10 基因-1082G/A、IFN- $\gamma$  基因+874A/T 位点多态性电泳图

2. 两位点基因型、等位基因频率: 病例组和对照组 IL-10 -1082G/A 位点、IFN- $\gamma$  +874A/T 位点基因型、等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。病例组 IL-10 -1082G/A 位点 G/G 纯合子、G/A 杂合子、A/A 纯合子基因型频率分别为 1.5%、13.1%、85.4%; G、A 等位基因频率分别为 8.1%、91.9%。对照组 G/G 纯合子、G/A 杂合子、A/A 纯合子基因型频率分别为 0.5%、22.0%、77.5%; G、A 等位基因频率分别为 11.5%、88.5%。经  $\chi^2$  检验, 两组间 G、A 等位基因的频率分布没有差异 ( $P > 0.05$ ); 但病例组 A/A 基因型高于对照组, G/A 基因型低于对照组 ( $P < 0.05$ )。带 A/A 基因型人群可能更容易感染肺结核, 其风险系数为 1.69 (95% CI: 1.04 ~ 2.81)。见表 2。病例组 IFN- $\gamma$  +874A/T 位点 T/T 纯合子、T/A 杂合子、A/A 纯合子基因型频率分别为 3.2%、21.7%、75.1%; T、A 等位基因频率分别为 14.0%、86.0%。对照组 T/T 纯合子、T/A 杂合子、A/A 纯合子基因型频率分别为 1.6%、

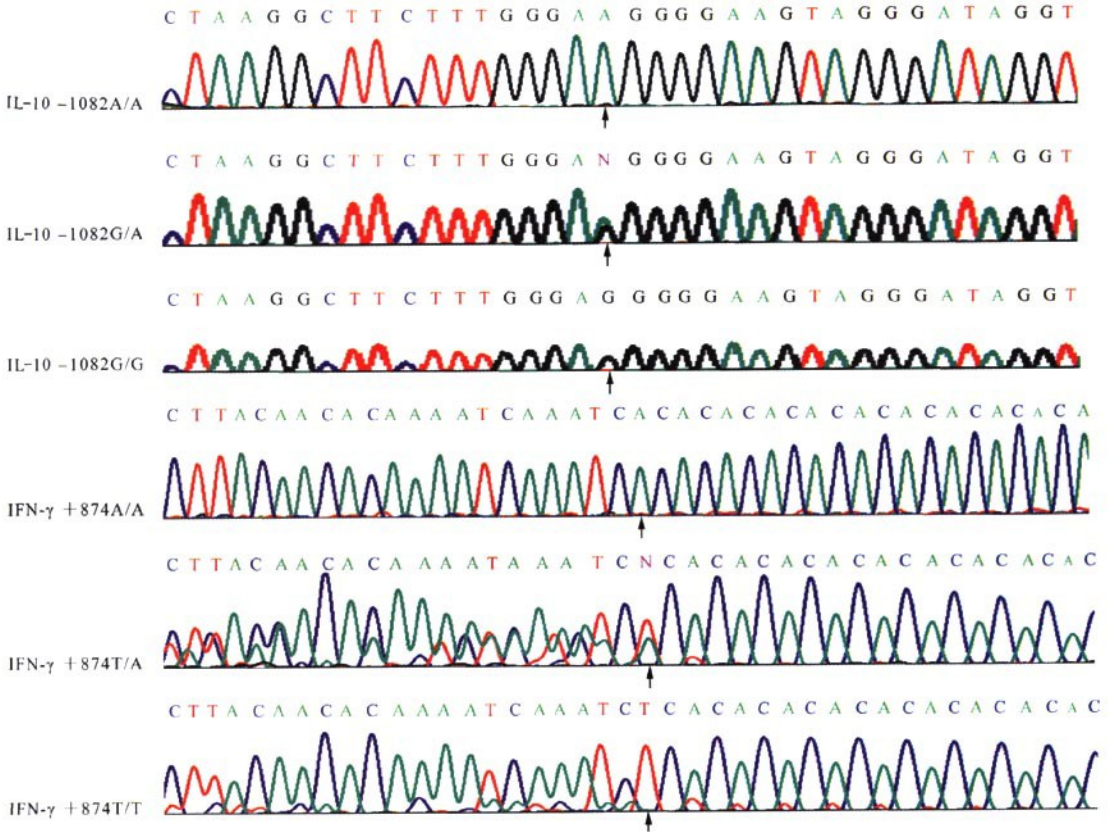


图2 两位点DNA测序结果(箭头示多态性位点)

表2 IL-10、IFN-γ基因多态性在病例组和对照组中的分布

基因	位点	等位基因	基因型	病例组 <sup>a</sup>	对照组 <sup>a</sup>	P值	OR值(95%CI)
IL-10	-1082		G/G	3(1.5)	1(0.5)	0.37	-
			G/A	26(13.1)	44(22.0)	0.02	0.54(0.32 ~ 0.91)
			A/A	169(85.4)	155(77.5)	0.04	1.69(1.04 ~ 2.81)
		G	32(8.1)	46(11.5)	0.10	-	
		A	364(91.9)	354(88.5)	0.10	-	
IFN-γ	+874		T/T	6(3.2)	3(1.6)	0.34	-
			T/A	41(21.7)	49(25.6)	0.36	-
			A/A	142(75.1)	139(72.8)	0.60	-
		T	53(14.0)	55(19.5)	0.88	-	
		A	325(86.0)	327(80.5)	0.88	-	

注：<sup>a</sup>括号外数据为人数，括号内数据为构成比(%)

25.6%、72.8%；T、A等位基因频率分别为19.5%、80.5%。两组人群等位基因、基因型分布频率差异无统计学意义(P>0.05)。见表2。

### 讨 论

有研究认为IL-10基因转录起始位点前-1082G/A、-819T/C、-592A/C位点的SNP可影响IL-10的表达<sup>[3,4]</sup>。在转录起始位点-1082处,G的出现与外周血单核细胞IL-10产生增多相关,而A则

与IL-10产生减少有关<sup>[5]</sup>。Oral等<sup>[6]</sup>应用序列特异性引物PCR检测土耳其结核患者及对照组IL-6、IL-10、IFN-γ、TGF-β和TFN-α基因多态性,其中发现结核患者组IL-10-1082G等位基因频率显著高于对照组;提示IL-10基因多态性可能影响结核病的易感性。Scola等<sup>[7]</sup>研究也发现结核人群IL-10-1082A/A基因携带者下降。我国在广东的研究也得到同样的结论<sup>[1]</sup>。但López-Maderuelo等<sup>[8]</sup>在西班牙人群的研究显示IL-10-1082G/A多态位

点与结核病的易感性无相关。而Oh等<sup>[9]</sup>在韩国的研究却发现结核新发病例组及再发的结核病例组IL-10 A/A基因型频率显著高于健康对照组,A等位基因在两个结核组中都有很高的频率,是患结核病的危险因素。与本研究结果相似;肺结核组A/A基因型频率明显较高,带A/A基因型人群可能更容易感染肺结核,但两组间G、A等位基因的频率分布没有差别。IL-10基因多态性究竟通过什么途径调节IL-10表达分泌,目前还不是很清楚。我们推测在中国汉族人群中IL-10 -1082G/A基因多态性对IL-10表达有影响,A/A基因型可能是一个高分泌表达基因。另外,IL-10 -1082G/A基因多态性频率也同样存在明显种族人群的分布差异。

IFN- $\gamma$ 基因定位于12q14,在第一内含子非编码区存在C/A重复序列多态性,C/A重复序列5'端+874有A→T SNP。在不同人群中进行的研究表明,IFN- $\gamma$ 第一内含子(+874 A/T)的基因多态性通过NF- $\kappa$ B结合位点影响IFN- $\gamma$ 产生,并且与结核病易感性相关<sup>[8,10,11]</sup>。但在西班牙人群中具有+874A等位基因的纯合子个体患肺结核风险是其他个体的3.75倍<sup>[8]</sup>。基因多态性影响结核菌素诱导的IFN- $\gamma$ 水平,A/A基因型纯合子结核病患者初诊及治疗后IFN- $\gamma$ 水平最低。多变量分析表明,A/A基因型存在和淋巴细胞绝对数是影响IFN- $\gamma$ 表达水平的独立预测因素。但Moran等<sup>[12]</sup>在美国的研究并没有发现IFN- $\gamma$  +874A/T多态性与结核易感性相关。Selvaraj等<sup>[13]</sup>在印度的研究同样认为IFN- $\gamma$ (+874、+5644)基因多态与IFN- $\gamma$ 分泌水平及肺结核无关,并认为当前结果之间的差异可能是由于种族特异的单倍型结构不同所致。本研究结果支持Selvaraj等的观点。

参 考 文 献

[1] Ma ZM, Xiao T, Lin G, et al. Association of polymorphisms of interleukin-10 gene with susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Guangdong Med J*, 2007, 28 (8) : 1243-1245. (in Chinese)  
马志明,肖唐,林国,等. 白介素-10基因多态性与肺结核病易感性的研究. *广东医学*, 2007, 28(8): 1243-1245.

[2] Lio D, Marino V, Serauto A, et al. Genotype frequencies of

the + 874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- $\gamma$  gene in a sample of sicilian patients. *Eur J Immunogenetics*, 2002, 29(5): 371-374.

[3] Awad MR, Webber S, Boyle G, et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant*, 2001, 20(6): 625-630.

[4] Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, et al. Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10 -1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168 (4): 476-480.

[5] Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 1997, 24(1): 1-8.

[6] Oral HB, Budak F, Uzassan EK, et al. Interleukin-10(IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis. *Cytokine*, 2006, 35(4): 143-147.

[7] Scola L, Crivello A, Marino V, et al. IL-10 and TFN-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy. *Mech Ageing Dev*, 2003, 124(4): 569-572.

[8] López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, et al. Interferon- $\gamma$  and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(7): 970-975.

[9] Oh JH, Yang CS, Noh YK, et al. Polymorphisms of interleukin-10 and tumors necrosis factor - a genes are associated with newly diagnosed and recurrent pulmonary tuberculosis. *Respirology*, 2007, 12(4): 594-598.

[10] Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al. An essential role for interferon- $\gamma$  in resistance to mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*, 1993, 178(6): 2249-2254.

[11] Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, et al. Association between tuberculosis and a polymorphic NF kappa B binding site in the interferon gamma gene. *Lancet*, 2003, 361(9372): 1871-1872.

[12] Moran A, Ma X, Reich RA, et al. No association between the + 874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11 (1): 113-115.

[13] Selvaraj P, Alagarasu K, Harishankar M, et al. Cytokine gene polymorphisms and cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, 2008, 43(1): 26-33.

(收稿日期:2009-08-14)

(本文编辑:尹廉)