

白细胞介素 8 基因 -251A/T 多态与子宫内膜异位症的相关性研究

曲冬颖 李 巨 陈 红 裴丽鹏 陈 静 陈 佳

(沈阳军区第 202 医院妇产科 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的 探讨白细胞介素 8 基因(IL-8)-251A/T 多态性在子宫内膜异位症发生中的作用。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)和焦磷酸测序方法,研究 152 例子宫内膜异位症患者和 134 例正常子宫内膜中 IL-8 基因 -251A/T 多态性的分布情况。结果 IL-8 基因 -251A/T 多态位点的 AA、AT 和 TT 基因型在子宫内膜异位症组中分别为 12.5%、46.1%、41.5%,等位基因 A 和 T 的频率分别为 35.5%、64.5%;在对照组中 AA、AT 和 TT 三种基因型分布频率分别为 24.6%、41.0%、34.3%,等位基因 A 和 T 的频率分别为 45.1%、54.9%。IL-8 基因 -251A/T 单核苷酸多态是子宫内膜异位症发病的独立的危险因素($P<0.05$);A 等位基因携带者患子宫内膜异位症的风险增高($P<0.05$)。结论 在中国北方汉族人群中 IL-8 基因 -251A/T 单核苷酸多态性与子宫内膜异位症的发病具有相关性,A 等位基因是子宫内膜异位症发病重要的遗传学标记。

关键词 子宫内膜异位症;白细胞介素 8 基因;多态性

中图分类号 R711.71 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)01-39-03

Relationship between IL-8 Gene Polymorphisms and Endometriosis

QU Dong-ying, LI Ju, CHEN Hong, PEI Li-peng, CHEN Jing, CHEN Jia

(Department of Obstetrics and Gynecology, 202 Hospital of PLA, ShenYang, 110016)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of IL-8 gene polymorphisms in the pathogenesis of endometriosis. **Methods:** The distribution of IL-8 gene -251A/T polymorphisms in 152 specimens of endometriosis and 134 specimens of normal endometrium was determined by RFLP-PCR and DNA sequencing. **Results:** IL-8 gene -251A/T polymorphism of the AA, AT and TT genotypes in the endometriosis group was 12.5%, 46.1% and 41.5%, while A and T allele frequencies were 35.5% and 64.5%, respectively. Genotypes in healthy adults were 24.6%, 41.0%, 34.3%, A and T allele frequencies were 45.1% and 54.9% respectively. The distribution of IL-8 gene -251 A/T polymorphism in the two groups was significantly different ($P<0.05$); the risk of endometriosis was markedly higher in the A allele carriers than that in the T allele carriers. **Conclusion:** The finding suggests that there is significant correlation between IL-8 gene -251A/T polymorphisms and the pathogenesis of endometriosis.

Key words: Endometriosis; IL-8 gene; Polymorphisms

Chinese Library Classification(CLC): R711.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-39-03

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是育龄妇女的常见病^[1-4]。研究表明 EMs 可能是由基因因素和环境因素共同导致的多基因疾病,其发病机制取决遗传、环境、体液、免疫等多种因素共同作用的结果^[5-8]。白细胞介素-8(IL-8)是一种具有多种免疫抑制及刺激功能的重要免疫调节因子^[9,10]。研究发现子宫内膜异位症患者 IL-8 的蛋白表达水平明显增高于正常人,IL-8 的蛋白的分泌可能在子宫内膜异位症的发病过程中发挥着重要作用^[11-13]。IL-8 基因启动子区域存在单核苷酸多态性(-251A/T 位点),其基因多态性与 IL-8 基因转录和蛋白表达水平呈明显的相关关系^[14]。本研究探讨对中国北方汉族妇女群体中 IL-8 基因启动子 -251A/T 的多态性分布与子宫内膜异位症发病之间的相关关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2006 年 12 月至 2010 年 8 月期间在沈阳军区第 202 医院经腹腔镜或开腹手术和病理确诊的子宫内膜异位症患者 152 例,年龄 26~50 岁,平均(35.6±11.2)。按美国生育学会 r-AFS 分期 I-期 76 例,III-IV 期 86 例。对照组 随机选择健康妇女,经沈阳军区第 202 医院门诊查体无遗传家族史,无肿瘤及子宫内膜异位等疾病 134 例,年龄 23~51 岁,平均(34.6±12.1)岁。两组均为无血缘关系的辽宁籍汉族妇女,均排除炎症、自身免疫性疾病,术前 6 个月未应用性激素类及免疫抑制剂类药物,否认遗传病家族史,年龄及月经周期分布差异。

1.2 研究方法

1.2.1 基因分型 常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA,稀释 DNA 样本并用紫外可见分光光度计检测 DNA 浓度,保证各 DNA 样本浓度基本一致,-20℃冰箱储存备用。本实验选择 IL-8 基因 -251A/T 单核苷酸多态进行研究。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增基因组 DNA,引物按照 Primer 5.0 以及 Oligo 6 软件设计如下,正义引物 5'-CTGCTCTGTCG-TACTTTCTG-3';反义引物 5'-CAGAA AGTACGACA-GAGCAG-3'。50μl PCR 反应体系中含:10× 缓冲液 5 μl,2.5 mmol/L dNTP 4 μl;引物各 20 pmol;模板 DNA 0.2 μg;耐热

作者简介 曲冬颖(1976-)女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:子宫内膜异位症的诊断与治疗。Tel:13352450135, Email: xiaolindianyu75@sina.com
(收稿日期:2011-05-31 接受日期:2011-06-27)

DNA 聚合酶 4 μl ;去离子水加至 50 μl ,所有试剂均为大连宝生物公司产品。扩增反应在热循环仪(Bio-Rad)上完成 ,循环参数为 :94 ℃ 预变性 3 分钟 ,94 ℃ 变性 30 秒 ,60 ℃ 退火 30 秒 ,72 ℃ 延伸 30 秒 ,共 35 个循环 ,72 ℃ 最后延伸 7 分钟 ,4 ℃ 保存 ,取 PCR 产物 15μL ,加 10U MfeI (New England Biolabs)内切酶 ,10x 酶切缓冲液 ,加 ddH₂O 补至总体积 20 μl ,37℃ 酶切 6 h。取酶切产物加入 3% 琼脂糖凝胶中 ,于 100V 电泳 30min 后取出 ,用凝胶分析系统观察电泳结果。用酶切法已鉴定出基因型的标本中随机抽取 10 例 ,PCR 扩增产物经纯化后 ,产物按标准程序在 ABI 3100 全自动序列分析仪上进行单向测序并分析。

1.2.2 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件包进行统计处理 ,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 t 检验 ,非正态分布采用转换数据 ,不能转换为正态分布者采用秩和检验 ,计数资料用 χ^2 检验 ,采用比值比(或优势比 ,OR)评价相对危险度 ,根据 Woolf 公式计算 OR 值 ,并通过 χ^2 -test 和 95%CI 评价 OR 的显著性 ;变量间的相互关系采用 Spearman 等级相关分析和 Logistic 多元回归分析 ,以 P<0.05 为差异有统学意义。

2 结果

IL-8-251A/T 多态等位基因的测定,对照组与子宫内膜异位症组患者之间 IL-8-251A/T 多态的基因型分布经 χ^2 检验 P>0.05 ,符合 Hardy-Weinberg 平衡规律 ,结果表明两组患者均来自同一群体。

IL-8-251A/T 多态性位点 PCR 产物片段长度为 331 bp ,TT 基因型酶切片段的长度为 331 bp ,AT 基因型酶切片段的长度为 331 bp 、235 bp 和 96 bp 的三条片段 ,AA 基因型酶切片段

的长度为 235 bp 和 96 bp 的两条片段 ,IL-8 基因 -251A/T 多态酶切电泳图谱见图 1。中国北方汉族人群中 IL-8 基因 -251A/T 多态性的 AA 纯合子频率最低 ,IL-8-251A/T 多态性 AT 杂合子表型的频率最高 ,IL-8-251A/T 多态性 TT 纯合突变的频率次之。而 IL-8 -251A/T 各种基因型频率在对照组与子宫内膜异位症组之间存在显著性差异 ,IL-8 基因 -251A/T 多态位点的 AA、AT 和 TT 基因型在子宫内膜异位症组中分别为 12.5 %、46.1 %、41.5 % ,等位基因 A 和 T 的频率分别为 35.5 %、64.5 % ;在对照组中 AA、AT 和 TT 三种基因型分布频率分别为 24.6%、41.0 %、34.3 % ,等位基因 A 和 T 的频率分别为 45.1%、54.9 %。IL-8 基因 -251A/T 单核苷酸多态是子宫内膜异位症发病的独立的危险因素(P<0.05) ,A 等位基因携带者患子宫内膜异位症的风险增高 (OR=0.669,95%CI=0.47~0.93)(见表 1)。

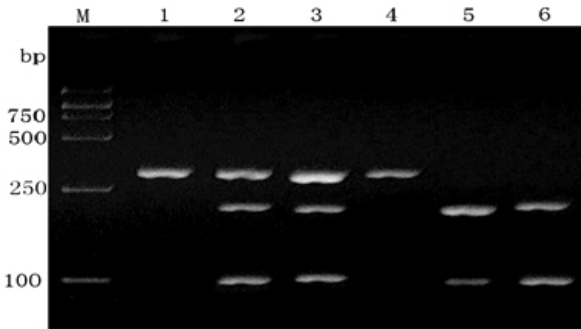


图 1 IL-8 基因 -251AT 多态基因型鉴定 M 为 DL2000 ,其中 1、4 为 TT 型 2、3 为 AT 型 5、6 为 AA 型
Figure1 IL-8 gene-251A/T polymorphism genotyping:M is DL2000; 1, 4 for the TT-type; 2,3 for the AT type; 5,6 for the AA type

表 1 子宫内膜异位症组与对照组 IL-8 基因 -25A/T 位点基因型分布和等位基因频率

Table 1 IL-8 gene -251 A/T locus genotype distribution and allele frequency between Endometriosis group and control group

	Control (n=134)	Endometriosis (n=152)	X ²	P value	OR	95%CI
A/A(%)	33 (24.6)	19(12.5)		0.02		
A/T(%)	55 (41.0)	70(46.1)				
T/T(%)	46 (34.3)	63(41.5)				
A allele	121(45.1)	108(35.5)	5.49	0.01	0.669	0.47-0.93
T allele	147(54.9)	196(64.5)				

3 讨论

子宫内膜异位症是育龄期妇女的一种常见病多发病 ,其发病机制目前尚不明确^[1-3]。研究发现遗传和环境因素在子宫内膜异位症的发病中起着重要的作用。近年来在免疫系统反应中发挥重要作用的细胞因子在子宫内膜异位症发病过程的作用越来越受到关注^[4]。IL-8 在子宫内膜异位症发病过程中发挥着重要的免疫调节作用 ,IL-8 是一种非常重要的免疫调节因子 ,具有多种免疫抑制及免疫刺激作用^[9]。研究发现子宫内膜异位症 IL-8 水平显著升高程度与子宫内膜异位症发病的严重程度密切相关^[13]。IL-8 作为一种细胞因子在子宫内膜异位症发病过程

参与了子宫内膜异位症发病过程的体液免疫的调节 ,同时 IL-8 又能引起免疫刺激作用 ,通过体液免疫机制激活 T 细胞 ,使单核细胞的抗原提呈能力降低 ,同时阻断单核、巨噬细胞产生炎症细胞因子 ,在体液免疫调节中细胞毒性 T 淋巴细胞对子宫内膜异位症产生的内膜细胞的有效杀伤能力降低 ,IL-8 参与了子宫内膜异位症患者自身的免疫调节反应^[15,16] ,故 IL-8 细胞因子可能在子宫内膜异位症的发生发展过程中发挥着非常重要的病理生理作用^[17]。

IL-8 是趋化性细胞因子超家族的一员 ,IL-8 基因定位于第 4 号染色体 ,分子量为 8-10kD ,IL-8 基因启动子区 -251A/T 多态 A/T 变异可能改变了启动子与转录因子的结合^[17] ,进而引起

IL-8 蛋白表达水平的增高,从而参与子宫内膜异位症发生发展病理过程。本研究发现而 IL-8-251A/T 多态的 AA 基因型频率和 A 等位基因的频率在对照组与子宫内膜异位症组之间存在显著性差异($P < 0.05$)(见表 1)。由于本研究是单中心的实验,还需要在其他的中心进行上述结果的验证,本研究没有对 IL-8 基因的其它多态位点进行病例及对照之间的关联研究,因此尚不能完全排除该基因其他区域如外显子区以及启动子其他区域的多态性与子宫内膜异位症是否存在相关关系,所以有必要进一步检测子宫内膜异位症的与 IL-8 基因其它多态是否与子宫内膜异位症的发生及发展存在相关关系^[18-20]。

子宫内膜异位症是一组由环境和遗传因素共同作用的多基因遗传病。因此,探讨相关基因多态性与疾病发生的关系,可进一步阐明其发病机理。随着研究的进一步深入,从基因水平调控及阻断 IL-8 的表达,为临床诊疗开辟新途径而提供分子遗传学的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Ruhland B, Agic A, Krampe J, et al. Innovations in conservative endometriosis treatment: an updated review [J]. Minerva Ginecol, 2011,63(3):247-259
- [2] Langmár Z, Sziller P. Endometriosis [J]. Orv Hetil, 2011,152 (25): 1013-1018
- [3] Nishida M, Nasu K, Narahara H. Role of chemokines in the pathogenesis of endometriosis [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2011,3:1196-1204
- [4] Li L, Leng JH, Lang JH, et al. Diagnosis and treatment of ureter endometriosis [J]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2011,46(4):266-270
- [5] Canis M, Manhes H, Mage G. Increased diagnostic accuracy of laparoscopy in endometriosis using indigo carmine: a new technique [J]. Fertil Steril, 2011,95(7):31
- [6] Jacobson TZ. Potential cures for endometriosis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011,1221:70-74
- [7] Chen R, Yang Z, Ji D, et al. Polymorphisms of the IL8 gene correlate with milking traits, SCS and mRNA level in Chinese Holstein [J]. Mol Biol Rep, 2011,38(6):4083-4088
- [8] Garey KW, Jiang ZD, Ghantaji S, et al. A common polymorphism in the interleukin-8 gene promoter is associated with an increased risk for recurrent *Clostridium difficile* infection [J]. Clin Infect Dis, 2010,51(12):1406-1410
- [9] Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, et al. Chouchane L. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness [J]. BMC Cancer, 2010,12(10):283
- [10] Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, et al. Association of haplotypes in the IL8 gene with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population [J]. Clin Chim Acta, 2010,411(17-18):1264-1268
- [11] Zabaleta J, Camargo MC, Ritchie MD, et al. Association of haplotypes of inflammation-related genes with gastric preneoplastic lesions in African Americans and Caucasians [J]. Int J Cancer, 2011,128 (3): 668-675
- [12] Sharpe-Timms KL, Nabli H, Zimmer RL, et al. Inflammatory cytokines differentially up-regulate human endometrial haptoglobin production in women with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2010,25 (5): 1241-1250
- [13] Kim JY, Lee DH, Joo JK, et al. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on interferon -gamma -induced protein-10 (CXCL10) and interleukin-8 (CXCL8) released by neutrophils and CD4+ T cells [J]. Am J Reprod Immunol, 2009,62 (3): 128-138
- [14] Nezhat F, Datta MS, Hanson V, et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review [J]. Fertil Steril, 2008,90 (5): 1559-1570
- [15] Ulukus M, Ulukus EC, Tavmergen Goker EN, et al. Expression of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein 1 in women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2009,91(3):687-693
- [16] Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin IL6, IL-8, tumor necrosis factor, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor- with colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2003,63:3560-3566
- [17] Rovin, B.H., L. Lu, X. Zhang, et al. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis [J]. Kidney Int, 2002,2: 261-265
- [18] Li ZW, Wu Y, Sun Y, et al. Inflammatory cytokine gene polymorphisms increase the risk of atrophic gastritis and intestinal metaplasia [J]. World J Gastroenterol, 2010,16(14):1788-1794
- [19] Kietthubthaw S, Wickliffe J, Sriplung H, et al. Association of polymorphisms in proinflammatory cytokine genes with the development of oral cancer in Southern Thailand [J]. Int J Hyg Environ Health, 2010,213(2):146-152
- [20] Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects [J]. Hum Reprod Update, 2006,12(1): 49-56