

## IL-23 受体基因多态性和克罗恩病的相关性研究 \*

王明辉<sup>1</sup> 万 荣<sup>1,2,△</sup> 程细祥<sup>3,4</sup> 王兴鹏<sup>1</sup> 刘占举<sup>1</sup> 郑 萍<sup>2</sup>

(1 同济大学附属第十人民医院消化内科 上海 200072 2 上海交通大学附属上海第一人民医院消化内科 上海 200080 ;

3 上海仁爱医院检验科 上海 200235 4 复旦大学生命科学学院 上海 200433)

**摘要** 目的 探讨白介素 23 受体 (IL-23R) 基因 rs11465779 位点多态性与克罗恩病 (Crohn's Disease, CD) 的关系。方法 从 98 例上海本地汉族 CD 患者和 90 例正常对照者外周血标本中提取基因 IBD 组 DNA, 用聚合酶链式反应 - 限制性片段长度多态 (PCR-RFLP) 技术检测 IL-23R 基因 rs11465779 位点变异情况, 分析其基因型、基因频率与 IBD 的关系。结果 IL-23R 基因 rs11465779 位点基因型和等位基因频率在 CD 组和对照组中分布差异无显著性 ( $P>0.05$ ), 且该位点多态性和 CD 发病年龄及性别均无相关。结论 IL-23R 基因 rs11465779 位点多态性变异, 可能不是中国南方汉族人群 CD 发病的危险因素。

**关键词** 克罗恩病; 白细胞介素 23 受体; 多态性; 限制性片段长度; 基因

**中图分类号**: R574, Q75, Q78 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273 (2012) 11-2014-03

## Relativity Research on the Interleukin(IL)-23 Receptor Gene Polymorphism and Crohn's Disease\*

WANG Ming-hui<sup>1</sup>, WAN Rong<sup>1,2,△</sup>, CHENG Xi-xiang<sup>3,4</sup>, WANG Xing-peng<sup>1</sup>, LIU Zhan-ju<sup>1</sup>, ZHENG Ping<sup>2</sup>

(1 Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China, PR China; 2 Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine,

Shanghai 200080; 3 Department of Laboratory Medicine, Shanghai Ren'ai Hospital, Shanghai 200235, China;

4 School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective**: To explore the association between the polymorphism of IL-23R gene and Crohn's disease (CD). **Methods**: Total 98 CD patients, and 90 healthy individuals were studied. The alleles and gene type of rs11465779 were analyzed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results**: The frequency of alleles and gene type were similar between CD and normal group ( $P<0.05$ ). Further analysis also did not display any relationship between the polymorphism and the onsetage or sex of CD ( $P>0.05$ ). **Conclusion**: The rs11465779 of IL-23R gene is not associated with susceptibility to Crohn's disease in Han population of South China.

**Key words**: IL-23R; Polymorphism; Restriction fragment length; Crohn's disease; Genes

**Chinese Library Classification (CLC)**: R574, Q75, Q78 **Document code**: A

**Article ID**: 1673-6273(2012)11-2014-03

## 引言

克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 的一种, 是一类肠道非特异性炎性肉芽肿性疾病, 具有慢性和反复性特征。目前认为遗传易感人群的肠黏膜免疫调节异常, 持续肠道感染, 肠黏膜屏障缺损和环境等因素共同参与了疾病发生过程。而克罗恩病的发病机制中, 免疫调节起着相当重要的作用。有资料表明, Th17 细胞的免疫学特征及其在 CD 发病机制中起到免疫病理作用<sup>[1]</sup>。同时近年来多数学者认为 IL-23/IL-17 通路模式在 CD 发病处于关键位置<sup>[2]</sup>。

2006 年 Duerr<sup>[3]</sup>发现的 IL-23R 基因上有 10 个 SNP 与 CD 有显著相关, 其中既有保护性的 SNP, 也有易感 SNP。而统计学差异最明显的是位点 rs11209026 (R381Q), 位于外显子。是一个非同义的 SNP 碱基 G 由 A 代替, 使其编码的蛋白质中的一个

谷氨酸变成精氨酸, 从而影响蛋白质功能。IL-23R 基因上 SNP 与 CD 的密切联系提示 IL-23R 在 CD 的发病过程中有举足轻重的地位<sup>[4]</sup>。但该基因多态性与中国人群 CD 发病的关系还不明确, 本研究通过选择了 IL-23R 基因的 rs11465779 位点, 并运用聚合酶链式反应 - 限制性片段长度多态 (PCR-RFLP) 技术阐明 IL-23R 基因 SNP 与中国人群 CD 发病可能存在的关系。

## 1 材料与方法

## 1.1 研究对象

全血标本收集自 2007 年 12 月至 2011 年 7 月间同济大学附属第十人民医院消化内科随访的 98 例 IBD 患者, 其中男 52 例、女 46 例, 年龄 17~58 岁 (平均 36.24 岁), 对照组为同期 90 例结肠镜检查无异常所见者, 其中男 48 例、女 42 例, 年龄 23~65 岁 (平均 39.35 岁)。CD 及 UC 患者性别、年龄组成与健康对照组间差异无统计学意义。所有患者及正常对照者标本留取前

\* 基金项目: 上海市科委基金 (08411962900; 08411962900)

作者简介: 王明辉 (1987-), 男, 硕士生, E-mail: wangminghui1987@hotmail.com

△通讯作者: 万荣, E-mail: wanrong1970@hotmail.com

(收稿日期: 2011-10-23 接受日期: 2011-11-20)

均签署知情同意书。入组患者诊断标准符合 2007 年中华医学会消化病学分会 IBD 协作组 " 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见 "。

### 1.2 PCR-RFLP 方法进行 IL-23R rs11465779 位点基因型及等位基因的检测

抽取 3mL 外周静脉血,加 0.8 mL 枸橼酸葡萄糖溶液抗凝,用 RelaxGene Blood DNA System(天根公司,中国)按试剂盒说明操作。引物:上游引物 5'-ATGCCAGTTTCTCCCTA-3',下游引物 5'-AAGGTAGGAAGGCAAGG-3' (上海捷瑞生物工程有限公司)。反应体系 去离子 H<sub>2</sub>O 40 μl;10× 扩增缓冲液 5 μl 20 μmol/L 上游引物 1 μl 20 μmol/L 下游引物 1 μl;20mmol/L 4 种 dNTP 混合物 (PH8.0) 1 μl 热稳定 Taq 酶 1 μl 模板 DNA 1 μl。94℃ 预变性 3min,72℃ 延伸 45s,退火温度 53℃ 45s,共 40 个循环:延伸 72℃ 10min。扩增产物经限制性内切

72℃ 酶 Mnl I 酶切后经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,在紫外透射仪下观察。

### 1.3 统计学处理方法

运用基因计数法计算各组基因型频率和等位基因频率,确认其符合 Hardy-Weinberg 平衡。计量资料两组间比较采用 t 检验,计数资料采用四格表  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验 IL-23R 基因的 rs11465779 等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律( $P>0.05$ ),表明其基因频率已达到遗传平衡,具有群体代表性。

2.2 SNP 关联分析 IL-23R 的 rs11465779 位点等位基因及基因型频率分布比较两组间比较差异均无显著性 ( $P>0.05$ ) (见表 1)。

表 1 CD 组与正常对照组 rs11365779 位点等位基因及基因型频率分布比较 例 (%)

Table 1 Compare of allele and genotype frequency of rs11365779 between CD and control group Quantity (%)

| Group         | n  | Allele Frequency |          | $\chi^2$ | P     | Genotype Frequency |          |        | $\chi^2$ | P     |
|---------------|----|------------------|----------|----------|-------|--------------------|----------|--------|----------|-------|
|               |    | A                | C        |          |       | AA                 | AC       | CC     |          |       |
| CD Group      | 98 | 155(78.3)        | 41(20.7) | 0.104    | 0.747 | 64(65.3)           | 27(27.6) | 7(7.1) | 0.743    | 0.690 |
| Control Group | 90 | 138(76.7)        | 42(23.3) |          |       | 54(60.0)           | 30(33.3) | 6(6.7) |          |       |

Note. P: CD group compared with control group

### 2.3 IL-23R 基因 rs11465779 A / C 与 CD 发病年龄、性别的关系比较 rs11465779 A / C 多态性与 CD 发病年龄、性别之间的

关系,结果差异无显著性( $P>0.05$ )(见表 2)。

表 2 rs11365779 A/C 与 CD 发病年龄、性别的关系 例 (%)

Table 2 The relation of rs11465779A/C, and the age of onset or sex of CD patients Quantity (%)

| Genotype Frequency | Age of Onset |             | $\chi^2$ | P     | Male Female |          | $\chi^2$ | P     |
|--------------------|--------------|-------------|----------|-------|-------------|----------|----------|-------|
|                    | <40Y (n=53)  | >40Y (n=45) |          |       | (n=52)      | n=(46)   |          |       |
| AA                 | 36(56.3)     | 28(43.7)    | 0.530    | 0.767 | 34(53.1)    | 30(46.9) | 0.063    | 0.969 |
| AC                 | 13(48.1)     | 14(51.9)    |          |       | 14(51.9)    | 13(48.1) |          |       |
| CC                 | 4(57.1)      | 3(42.9)     |          |       | 4(57.1)     | 3(42.9)  |          |       |

## 3 讨论

克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 作为一种炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 现仍是发病机制不明的慢性肠道非特异性炎性疾病。目前认为遗传易感人群的肠黏膜免疫调节异常, 持续肠道感染, 肠黏膜屏障缺损和环境等因素共同参与了疾病发生过程<sup>[5,6]</sup>。而与白细胞介素 17 (IL-17) 细胞因子家族和白细胞介素 23 (IL-23) 细胞因子相关的 Th17 细胞成为关于 CD 的发病机制的研究热点。IL-23 介导 CD4<sup>+</sup>T 细胞分化系通过 STAT3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路诱导幼稚 CD4<sup>+</sup>T 细胞向新型 Th 细胞 -IL-17 分泌性 Th 细胞(Th17 / ThIL-17)分化, 能通过与 IL12 的协同作用, 直接刺激成熟 Th17 释放 IL-17 等特异性促炎症因子的表达, 既所谓的 IL-23-IL-23R-IL-17 新型免疫通路<sup>[7,8]</sup>。IL-17 具有促炎症作用, 诱导促炎细胞因子(如 IL-6、TNF)、趋化

因子(MCP-1 和 MIP2)和基质金属等特异性蛋白酶(MMPs)的表达, 引起细胞浸润和组织破坏<sup>[9]</sup>。

通过免疫学和遗传学的研究发现, IL-23R 在 CD 发病机制中起到重要作用。而对于 IL-23R 保护性的基因突变, 可能改变了 IL-23 的信号传导, 抑制肠黏膜固有层中 Th17 细胞的活性及 IL-17 等促炎症因子的产生, 从而保护正常人发生严重的自身免疫应答。而 CD 患者由于缺乏或者低携带保护性突变体, 从而可能促使免疫系统对自身肠黏膜菌群的免疫应答, 导致 CD 的发生。目前国际上对于 CD 的遗传易感基因一直是研究热点, Dubinsky<sup>[10]</sup>等也证实 IL-23R 基因上的 R381Q 变异与非犹太人儿童的 CD 显著相关性。随后在世界各研究中心进行的验证实验中, 在欧洲儿童和成人 CD 患者中均验证了 IL23-R 中数个多态性位点与 CD 的相关性<sup>[10,11]</sup>。而在 Yamazaki 等<sup>[12]</sup>在日本人群中研究并未发现与 CD 发病间有联系的 IL-23R 基因多

态性。在国内学者研究中发现,CD 患者及健康对照组中均未发现与西方白人 CD 发病相关的 rs11209026 存在多态性<sup>[13]</sup>,而国外报道与 CD 发病可能相关的 rs1004819,rs7517847,rs2201841,在中国 CD 患者 - 健康对照组中没有发现在基因型和等位基因型频率上有显著性差异<sup>[14,15]</sup>。

本研究通过进行 CD 患者中 IL-23R 的 rs11465779 位点多态性分析,并未发现与中国南方汉族人群 CD 发病的有相关性。但需要扩大研究人群,提高样本量进行进一步分析,寻找中国人群中的与 CD 相关的遗传易感基因。

#### 参考文献 (References)

- [1] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3: 521-533
- [2] Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease [J]. Gut, 2008, 57: 1682-1689
- [3] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene[J]. Science, 2006, 314:1461-1483
- [4] Dubinsky MC, Wang D, Picomell Y, et al. Western Regional Research Alliance for Pediatric IBD.IL-23 receptor(IL-23R)gene protects against pediatric Crohn's disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007,13 (5): 511-515
- [5] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease [J]. N Engl J Med, 2009,361:2066-2078
- [6] Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, et al. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15:5784-5788
- [7] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation [J]. Immunity, 2004,21(4):467-476
- [8] Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R $\beta$ 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R[J]. J Immunol, 2002, 168:5699-5708
- [9] Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, et al. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis [J]. J Exp Med, 2006,203:2485-2494
- [10] Amre DK, Mack D, Israel D, et al. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children [J]. Am J Gastroenterol, 2008,103:615-620
- [11] Taylor KD, Targan SR, Mei L, et al. IL23R haplotype provide a large population attributable risk for Crohn's disease [J]. Inflamm Bowel Dis,2008,14:1185-1191
- [12] Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients[J]. J Hum Genet, 2007,2(7):575-583
- [13] 冯赞,吴恺,郑萍.溶质载体 22A4 和 5 基因多态性与中国汉族人群克罗恩病的关联分析[J].中华消化杂志,2009(1) 42-45  
Feng Yun, Wu Kai, Zheng Ping. Association of polymorphisms of solute carrier family 22 member 4/5 genes with Crohn's disease in Chinese Han nationality[J]. Chinese Journal of Digestion, 2009(1): 42-45
- [14] Yun Feng, Ping Zheng, Kai Wu, et al. SLC22A4 and SLC22A5 gene polymorphisms and Crohn's disease in Chinese Han population [J]. J Dig Dis,2009,10(3):181-187
- [15] 卢战军,郑萍.肉毒碱 / 有机阳离子转运体基因多态性与克罗恩病相关性的研究[J].胃肠病学, 2008,(1):61-63  
Lu Zhan-jun, Zheng Ping. Development of Relationship between Carnitine/Organic Cation Transporter Gene Polymorphism and Crohn's Disease[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2008,(1):61-63
- [16] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, et al. Integration of TGF- $\beta$ /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. EMBO J,2004,23(5):1155-1165
- [17] Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1[J]. Cell Biology And Toxicology,1991,88:3460-3464

#### (上接第 2004 页)

- [14] Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, et al. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins[J]. J Biomed Biotechnol,2010,2010: 402593
- [15] G H, Si L, Ag L. Distinct mechanisms of TGF- $\beta$ -mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis [J]. J Clin Invest,2005,115(7):1714-1723