

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2018.03.022

白介素-32 基因多态性及血清水平与多发性硬化遗传易感性的关联性^①

许朝卿 戴迟兵^② 汪应瑞 (三峡大学附属仁和医院神经内科,宜昌 443001)

中图分类号 R744.5+1 **文献标志码** A **文章编号** 1000-484X(2018)03-0427-04

[摘要] **目的:**探讨 IL-32 基因 rs28372698A/T、rs12934561C/T 及 rs11861531C/T 三个位点的多态性与多发性硬化 (MS) 的遗传易感的关系,为 MS 高危人群的确立提供理论依据。**方法:**入选 580 例 MS 患者和 650 例健康对照,应用单碱基延伸法和 DNA 测序对 IL-32 基因位点进行基因分型,同时,采用酶联免疫吸附试验检测两组 IL-32 的血清浓度。**结果:**IL-32 基因 rs28372698A/T 位点的基因型频率和对照组比较存在显著差异 ($P=0.007$),其等位基因频率在两组间的分布频率存在统计差异 ($P=0.033$)。rs12934561C/T 与 rs11861531C/T 的各基因型及等位基因频率在两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。T-T-T 单倍型在 HCC 中的分布频率显著高于对照组 ($P=0.012$)。T-T-T 单倍型与 MS 的发病风险密切相关 ($OR=1.968, 95\% CI: 1.352-2.574$)。MS 患者组的血清 IL-32 水平明显高于对照组 [$(399.08\pm156.85) \text{ pg/ml}$ vs $(239.99\pm88.35) \text{ pg/ml}$, $P=0.001$]。AT 和 TT 基因型的 MS 患者 IL-32 血清水平明显高于 AA 基因型 MS 患者 [$(465.53\pm172.40) \text{ pg/mL}$ vs $(295.86\pm103.96) \text{ pg/ml}$, $P<0.01$; $(491.15\pm133.65) \text{ pg/ml}$ vs $(295.86\pm103.96) \text{ pg/ml}$, $P<0.01$]。**结论:**本研究首次报道了 IL-32 基因 rs28372698 位点多态性与 MS 的关系,且 IL-32 的基因多态性在 MS 患者中对 IL-32 的血清水平有影响。我们的研究为 MS 遗传和个体化的诊疗提供了新的参考依据。

[关键词] 多发性硬化;白介素-32;基因多态性;单倍型

Association of interleukin-32 gene polymorphism and its serum levels with genetic susceptibility in patients with multiple sclerosis

XU Chao-Qing, DAI Chi-Bing, WANG Ying-Rui. Neurology Department, the Affiliated Renhe Hospital of Three Gorges University, Yichang 443001, China

[Abstract] **Objective:**To investigate interleukin-32 (IL-32) (rs28372698A/T, rs12934561C/T and rs11861531C/T) genetic susceptibility in patients with multiple sclerosis (MS) by case-control study, which provides a theoretical foundation for high-risk population with MS. **Methods:**A total 580 MS patients and 650 healthy controls were included in this study, polymerase chain reaction-single base extension (PCR-SEB) was used to test DNA sequencing, and serum levels of IL-32 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:**The genotype and allele frequency of IL-32 (rs28372698A/T) had significantly differences compared with healthy controls ($P=0.007, P=0.033$), however, there were no statistical differences in rs12934561C/T and rs11861531C/T between the two groups ($P>0.05$). T-T-T haploid genotype in patients with MS was higher than control groups ($P=0.012$), and T-T-T haploid genotype was associated with increased risk of MS ($OR=1.968, 95\% CI: 1.352-2.574$). Serum levels of IL-32 in patients with MS was increased compared with control groups [$(399.08\pm156.85) \text{ pg/ml}$ vs $(239.99\pm88.35) \text{ pg/ml}$, $P=0.001$]. The serum IL-32 concentrations in MS patients with AT and TT genotype were higher compared with MS patient with AA genotype [$(465.53\pm172.40) \text{ pg/ml}$ vs $(295.86\pm103.96) \text{ pg/ml}$, $P<0.01$; $(491.15\pm133.65) \text{ pg/ml}$ vs $(295.86\pm103.96) \text{ pg/ml}$, $P<0.01$]. **Conclusion:**Our study found that an association between IL-32 (rs28372698) gene polymorphism and MS, and serum levels of IL-32 were influenced by IL-32 gene polymorphism in patients with MS, suggesting a theoretical basis for individualized diagnosis and treatment of MS patients.

[Key words] Multiple sclerosis; Interleukin-32; Gene polymorphism; Haplotype

多发性硬化 (Multiple sclerosis, MS) 是一种累及中枢神经系统的炎性脱髓鞘病。以往的研究证实, MS 可能是遗传因素和环境因素共同作用所引起的中枢神经系统自身免疫性疾病,其发病机制不完全清楚^[1]。有研究表明,炎症在神经系统脱髓鞘病变的形成和发展中起着至关重要的作用^[2]。进一步研究发现,细胞因子在神经系统脱髓鞘病变中占有重要地位,炎症因子的水平与 MS 患者的疾病严重

①本文为湖北省自然科学基金项目(2014CFB688)。
②三峡大学附属仁和医院消化科,宜昌 443001。
作者简介:许朝卿,男,主治医师,主要从事脑血管病方面研究。
通讯作者及指导教师:汪应瑞,男,医学硕士,主任医师,主要从事中
枢神经系统脱髓鞘疾病方面研究, E-mail:
wangyinrui_100@sina.com。

程度有关^[3],白介素-32(Interleukin-3,IL-32)作为一种内源性的炎症调控因子,在炎症中起着关键作用^[4]。最近研究发现,IL-32 基因多态性与系统性红斑狼疮、急性肺损伤及癌症等多种炎症性疾病密切相关^[5-7]。因此,本研究探讨 IL-32 基因多态性与 MS 遗传易感性的关系,拟寻找一种新的炎症因子为临床 MS 的治疗提供潜在的靶点,同时,为 MS 高危人群的筛查提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选取 2012 年~2016 年于我院就诊的 MS 患者 580 例,所有病例的诊断均符合 2005 年 McDonald 的 MS 诊断标准及 1999 年 Wingerchuck NMO 的诊断标准^[8]。所有入选患者均为新确诊的患者,其中男性 360 例,女性 220 例,年龄(32.7±10.26)岁。同时,选取 650 例同期同地区健康无血缘关系的个体作为对照,其中男性 400 例,女性 250 例,年龄(33.2±9.18)岁。所有入选对象排除心血管疾病、高血压、糖尿病、肾功能不全、感染性疾病、免疫性疾病及其他恶性肿瘤性疾病。本次研究经过我院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 PCR 产物(德国 Qiagen 公司),虾碱酶和外切酶 I 分别购自美国 Promega 公司和 Epieentre 公司,SNaPshot Multiplex 试剂盒购自美国 ABI 公司,IL-32 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取和基因型检测 采集静脉血 2 ml 于 EDTA 抗凝管-20℃ 保存。DNA 的提取采用改良碘化钠法,经纯度鉴定后-20℃ 保存备用。上海天昊生物科技有限公司根据 IL-32 基因 rs28372698,rs12934561 及 rs11861531 位点多态性和已知的 DNA 序列设计 PCR 引物。rs28372698 位点的上下游引物序列分别为:5'-CCATGGGTGTG-GAGGTTTCATAAAG-3',5'-GAATGGAAGTCTTGAT-GGGAGAG-3'。rs12934561 位点的上下游引物序列分别为 5'-AGGCCCGAATGGTAAGCT-3',5'-CCA-CAGTGTCTCAGTGTAC-3'。rs11861531 位点的上下游引物序列分别为 5'-ATGAGTATGCCTGC-CGTGTG-3',5'-AATGCGGCATCTTCAAAC-3'。IL-32 的 PCR 扩增反应体系为 5 μl,其中包含 2.5 μl 缓冲液,0.25 μl 反应物,1.75 μl 去离子水。若扩增反应体系不足,则用灭菌双蒸水补足至 5 μl。扩增程序主要包括:95℃ 10 min 变性,92℃ 15 s 和 60℃

1 min 共 69 个循环。PCR 产物 4℃ 保存。采用 GeneMapper4.1 分析 SNP 分型。

1.2.2 血清 IL-32 水平的检测 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定 IL-32 血清水平,实验操作严格按照说明书进行。

1.3 统计学方法 采用 SPSS16.0 软件包进行统计分析。等位基因和基因型分布频率采用直接计数法计算,各分布频率比较采用卡方检验。IL-32 血清水平的组间比较采用 *t* 检验,遗传平衡检验采用 Hardy-Weinberg,采用 SHEsis 分析软件行连锁不平衡分析。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MS 患者临床特点 在所有入选的 MS 患者中,复发缓解型占 77.9%(452/580),继发进展型占 20%(116/580)以及进展型占 2.1%(12/580)。MS 患者的年龄和性别与对照组比较,无显著统计学意义(*P*>0.05,表 1)。

2.2 MS 患者组和健康对照组 IL-32 基因型频率比较结果 检测结果表明,rs28372698 位点存在 AA、AT、TT 3 种基因型。rs12934561 位点存在 TT、CT、CC 三种基因型。rs11861531 位点存在 CC、CT、TT 3 种基因型。两组三个位点的频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡(*P*>0.05),表明该基因型在所研究人群中分布已达到了遗传平衡。基因测序进一步验证了检测结果。IL-32 基因 rs28372698 A/T 位点的基因型频率存在显著差异($\chi^2=9.814, P=0.007$),其等位基因频率在两组间分布差异有统计学意义($\chi^2=4.561, P=0.033$)。rs12934561 C/T 与 rs11861531 C/T 的各基因型及等位基因频率在两组间差异无显著统计学意义(*P*>0.05,表 2)。

2.3 配对连锁分析及单倍基因型分析结果 采用 SHEsis 在线分析软件对 rs28372698 A/T、rs129345

表 1 MS 患者和健康对照基线资料的比较
Tab. 1 Comparison of basic information between MS patients and healthy controls

Item	MS patients (<i>n</i> =580)	Controls (<i>n</i> =650)	Statistics	<i>P</i>
Gender				
Male	360 (62.1%)	400 (61.5%)	0.037	0.848
Female	220 (37.9%)	250 (38.5%)		
Age(year)	32.7±10.26	33.2±9.18	0.042	0.967
Clinical types				
Relapsing-remitting	452 (77.9%)	-		
Secondary-progressive	116 (20%)	-		
Progressivity	12 (2.1%)	-		

61 C/T 以及 rs11861531 C/T 三个位点进行两两配对连锁不平衡分析,结果显示:三位点两两之间均存在连锁不平衡 (rs28372698 vs rs12934561, $D' = 0.874$; rs28372698 vs rs11861531, $D' = 0.795$; rs12934561 vs rs11861531, $D' = 0.931$)。进一步的单倍型分析结果显示,T-T-T 单倍型在 MS 中的分布频率显著高于对照组 ($P = 0.012$),T-T-T 单倍型与 MS 的发病风险密切相关 ($OR = 1.968, 95\% CI: 1.352-2.574$,表 3)。

2.4 IL-32 血清水平在两组比较结果 MS 患者

表 2 IL-32 基因 rs28372698A/T、rs12934561C/T 及 rs11861531 C/T 基因型在两组间的分布频率

Tab. 2 Genotype frequency distribution of IL-32 genes rs28372698A/T, and rs11861531 rs12934561C/T C/T between MS patients and controls

SNP genotyping	MS patients (<i>n</i> = 580)	Controls (<i>n</i> = 650)	Statistics	<i>P</i>
rs28372698 A/T				
Genotype				
AA	240(41.4%)	285(49.1%)	9.814	0.007 ¹⁾
AT	255(44.0%)	307(47.2%)		
TT	85(14.7%)	58(8.9%)		
Allele				
A	735(63.4%)	877(67.5%)	4.561	0.033 ²⁾
T	425(36.6%)	423(32.5%)		
rs12934561C/T				
Genotype				
CC	138(23.8%)	141(21.7%)	1.643	0.440
CT	312(53.8%)	345(53.1%)		
TT	130(22.4%)	164(25.2%)		
Allele				
C	588(50.7%)	627(48.2%)	1.483	0.223
T	572(49.3%)	673(51.8%)		
rs11861531C/T				
Genotype				
CC	192(33.1%)	214(32.9%)	0.122	0.941
CT	302(52.1%)	335(51.5%)		
TT	86(14.8%)	101(15.5%)		
Allele				
C	686(59.1%)	783(60.2%)	0.008	0.927
T	474(40.9%)	537(41.3%)		

Note:1) Gnotype frequency was statistically differences in AA,AT and TT;2) Allele was statistically difference between A and T.

表 3 IL-32 单倍基因型在 MS 患者与对照组之间的分布情况及风险分析

Tab. 3 Risk analysis andhaploid genotype distribution between MS patients and controls

IL-32 haplotype	MS patients(<i>n</i> = 1 160)	Controls(<i>n</i> = 1 300)	OR(95% <i>CI</i>)	<i>P</i>
A-C-C	540 (46.6)	598 (46.0)	0.952 (0.763-1.327)	0.863
A-T-T	40 (3.4)	53 (4.1)	0.869 (0.557-1.372)	0.652
A-C-T	12 (1.0)	15 (1.2)	0.832 (0.451-1.672)	0.556
T-C-C	435 (37.5)	503 (38.7)	0.613 (0.238-1.021)	0.358
T-T-T	38 (3.3)	14 (1.1)	1.968 (1.352-2.574)	0.012
A-T-C	95 (8.2)	117 (9.0)	1.966 (0.853-3.782)	0.184

组血清 IL-32 水平明显高于对照组 [(399.08 ± 156.85) pg/ml vs (239.99 ± 88.35) pg/ml, $P = 0.001$]。进一步,在所有 MS 患者中,按照 rs28372698 A/T 位点的 AA、AT、TT 基因型分为三组,AT 和 TT 基因型的 MS 患者 IL-32 血清水平明显高于 AA 基因型 MS 患者,差异存在显著统计学意义 [(465.53±172.40)pg/ml vs (295.86±103.96)pg/ml, $P < 0.001$; (491.15 ± 133.65) pg/ml vs (295.86 ± 103.96)pg/ml, $P < 0.001$]。而 AT 型与 TT 型间的 IL-32 血清水平无显著统计学差异 [(465.53 ± 172.40) pg/ml vs (491.15 ± 133.65) pg/ml, $P = 0.612$]。

3 讨论

随着人类基因扫描计划的推进,完成了人类基因组 DNA 序列测序和分析工作,基因多态性在疾病中的影响逐渐受到重视。有研究表明,抗炎和促炎因素的失衡在 MS 患者的发病中扮演了重要的角色^[9]。本研究发现,IL-32 基因位点 rs28372698 与 MS 相关。IL-32 基因 rs28372698 的三种基因型 (AA、AT 及 TT) 与等位基因 (A、T) 的分布频率在 MS 患者和健康人群中存在比较较大的差异,MS 患者的 T 等位基因携带明显高于对照组,携带 T 等位基因的 MS 患者血清 IL-32 的表达水平明显高于非携带者,提示 rs28372698 基因的变异促进 IL-32 的高表达。

研究发现 IL-32 基因位点 rs28372698 与 MS 相关。有报道表明,IL-32 的高表达与一些炎症性疾病和感染性疾病相关^[10,11],进一步研究发现,IL-32 牵涉到一些癌症相关疾病的发病机制^[12]。以往的研究证实,IL-32 可以促进一些炎症因子的高表达,如 TNF-α、IL-6 及 IL-8,同时,IL-32 也涉及到各种趋化因子的分泌和合成^[13,14]。最近的研究表明,IL-32 rs28372698A/T,rs129345-61C/T 及 rs11861531 C/T

三个位点的基因多态性与子宫内膜癌、类风湿关节炎及肺纤维化存在密切关系,这些研究证实了炎症机制可能与 IL-32 的基因位点突变存在联系^[15-17]。炎症在神经系统脱髓鞘病变的形成和发展是一个重要的因素。有研究证实,在 MS 患者外周血和脑脊液中,T 淋巴细胞肿瘤坏死因子的 mRNA 表达明显增加,表达水平与疾病严重程度相关,同时,IL-6 在 MS 患者血清中显著升高,显然,这些炎症的调控过程与 MS 的发病密切相关^[18-20]。重要的是,氧化应激参与了 MS 的病理生理过程^[21,22],这个过程通过影响机体活性氧-炎症平衡损伤神经系统的髓鞘^[23-25]。因此,IL-32 可能作为一种炎症调控因子参与了 MS 患者 IL-32 基因位点 rs28372698 的基因变异过程。

MS 的确切病因与发病机制至今不明,炎症因素在许多发病环节中起着重要作用。本研究首次单碱基延伸和 DNA 测序对 IL-32 基因位点进行基因分型,证实了 IL-32 基因和 MS 易感等位基因的关系。在此基础上进一步研究了 IL-32 相关的单倍型与 MS 的关系,这个发现将有助于阐明 MS 患者独特的免疫和炎症遗传学机制,我们的研究结果可能为 MS 的分子分型、风险预测、辅助诊断和治疗方案提供重要的参考依据。

参考文献:

- [1] Patejdl R, Penner IK, Noack TK, *et al.* Multiple sclerosis and fatigue: A review on the contribution of inflammation and immune-mediated neurodegeneration [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15 (3): 210-220.
- [2] Keswani A, Kern RC, Schleimer RP, *et al.* Role of interleukin-32 in chronic rhinosinusitis [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013, 13(1): 13-18.
- [3] Graber JJ, Ford D, Zhan M, *et al.* Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 185 (1/2): 168-174.
- [4] 李莉, 宝福凯. 白介素-32 及其与炎症性疾病的关系研究进展 [J]. *中国热带医学*, 2010, 10(6): 761-762, 770.
Li L, Bao FK. Advance in the research of relationship between IL-32 and inflammatory diseases [J]. *Chin Trop Med*, 2010, 10(6): 761-762.
- [5] Gonzalez-Hormazabal P, Musleh M, Bustamante M, *et al.* Role of cytokine gene polymorphisms in gastric cancer risk in Chile [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(7): 3523-3530.
- [6] Arcaroli JJ, Liu N, Yi N, *et al.* Association between IL-32 genotypes and outcome in infection-associated acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2011, 15(3): R138.
- [7] Wang Y, Yang Y, Zhu Y, *et al.* Polymorphisms and expression of IL-32: impact on genetic susceptibility and clinical outcome of lung cancer [J]. *Biomarkers*, 2017, 22(2): 165-170.
- [8] 中华医学会神经病学分会. 中国多发性硬化及相关 CNS 脱髓鞘疾病的诊断和治疗专家共识 (草案) [J]. *中华神经科杂志*, 2006, 39(12): 862-864.
Inese medical association neurology branch. The diagnosis and treatment of China's multiple sclerosis and related demyelinating centerl nerovus system disease (Draft) [J]. *Chin J Neurol*, 2006, 39(12): 862-864.
- [9] Macchi B, Marino-Merlo F, Nocentini U, *et al.* Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: Comparative analysis between the periphery and the central nervous system [J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 287(287): 80-87.
- [10] Khawar MB, Abbasi MH, Sheikh N. IL-32: A novel pluripotent inflammatory interleukin, towards gastric inflammation, gastric cancer, and chronic rhino sinusitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 8413768.
- [11] Kim S. Interleukin-32 in inflammatory autoimmune diseases [J]. *Immune Netw*, 2014, 14(3): 123-127.
- [12] Wang J, Wang Q, Han T, *et al.* Soluble interleukin-6 receptor is elevated during influenza A virus infection and mediates the IL-6 and IL-32 inflammatory cytokine burst [J]. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(5): 633-644.
- [13] Netea MG, Lewis EC, Azam T, *et al.* Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(9): 3515-3520.
- [14] Sietta M, Baraldo S, Corbino L, *et al.* CD8⁺ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(2): 711-717.
- [15] Yu XZ, Zhou B, Zhang Z, *et al.* Significant association between IL-32 gene polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer in Chinese Han women [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(7): 5265-5272.
- [16] Meyer B, Chavez RA, Munro JE, *et al.* DNA methylation at IL32 in juvenile idiopathic arthritis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(5): 11063.
- [17] Li D, Chen D, Zhang X, *et al.* c-Jun n-terminal kinase and Akt signalling pathways regulating tumour necrosis factor- α -induced interleukin-32 expression in human lung fibroblasts: implications in airway inflammation [J]. *Immunology*, 2015, 144 (2): 282-290.
- [18] Mansouri B, Horner ME, Menter A. Tumor necrosis factor- α inhibitor use in psoriasis patients with a first-degree relative with multiple sclerosis [J]. *J Drugs Dermatol*, 2015, 14(8): 876-878.
- [19] Yan J, Liu J, Lin CY, *et al.* Interleukin-6 gene promoter-572 C allele may play a role in rate of disease progression in multiple sclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10): 13667-13679.
- [20] Horellou P, Wang M, Keo V, *et al.* Increased interleukin-6 correlates with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pediatric monophasic demyelinating diseases and multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2015, 289(15): 1-7.
- [21] Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis [J]. *Lancet Neurol*, 2002, 1(4): 232-241.
- [22] Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, *et al.* Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis [J]. *J Neurol*, 2006, 253 (4): 483-487.
- [23] Gray E, Thomas TL, Betmouni S, *et al.* Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 444(2): 195-198.
- [24] Zeis T, Probst A, Steck AJ, *et al.* Molecular changes in white matter adjacent to an active demyelinating lesion in early multiple sclerosis: molecular changes in MS periplaque white matter [J]. *Brain Pathol*, 2009, 19(3): 459-466.
- [25] Fischer MT, Sharma R, Lim JL, *et al.* NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury [J]. *Brain*, 2012, 135 (Pt 3): 886-899.

[收稿 2017-09-27]

(编辑 倪鹏 刘格格)