

深圳地区类风湿关节炎患者 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与血清中 IL-17A, IL-38 水平表达的相关性研究

雷明玲¹, 彭常基², 张肄鹏¹, 杨海珊¹

(1. 深圳市龙华区中心医院检验科, 广东深圳 518110; 2. 深圳市龙岗区南湾预防保健所, 广东深圳 518114)

摘要: **目的** 了解深圳地区类风湿关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 患者 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与血清中 IL-17A, IL-38 水平表达的相关性。**方法** 选择 103 例 RA 患者作为 RA 组, 另选取 116 例非 RA 健康人群作为对照组。分别检测 IL-17A, IL-38 及类风湿因子 (rheumatoid factors, RF) 水平, 同时对 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性进行分析。**结果** RA 组 IL-17A 和 RF 水平 (54.06 ± 1.87 pg/ml 和 29.65 ± 4.02 IU/ml) 明显高于对照组 (33.29 ± 1.42 pg/ml 和 5.27 ± 1.38 IU/ml), 而 IL-38 水平 (40.92 ± 8.67 pg/ml) 明显低于对照组 (53.78 ± 12.04 pg/ml), 两组差异有统计学意义 ($t=7.2065, 18.2972, 5.0197$, 均 $P<0.05$)。RA 组随着病情活动度的加重 IL-17A 和 RF 水平明显升高, 而 IL-38 水平明显降低, 不同活动度之间差异均有统计学意义 ($F=12.5271, 7.9351, 9.2702$, 均 $P<0.05$)。RA 组 IL-17A 基因 rs2275913 位点 AA 基因型和 A 等位基因检出率 (47.57% 和 63.11%) 明显高于对照组 (15.52% 和 30.60%), 两组差异有统计学意义 ($\chi^2=5.9256, 4.0272$, 均 $P<0.05$)。RA 组 AA 基因型 IL-17A 水平比 AG 和 GG 基因型明显升高, 而 IL-38 水平明显降低, 不同基因型之间差异有统计学意义 ($F=7.0625, 5.1873$, P 均 <0.05), 但不同基因型 RF 水平差异无统计学意义 ($F=1.0961, P=0.1205$)。经 Spearman 相关性分析, RA 组 IL-17A 水平与 RF 水平呈正相关, 而与 IL-38 水平呈负相关 ($r=0.5012, -0.6924$, 均 $P<0.05$)。**结论** RA 组 IL-17A 水平明显升高, 且随病情活动度加重而升高。同时 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与深圳地区 RA 发病的易感性相关, 其中 AA 基因型可能是 RA 发病的易感危险基因之一。

关键词: 类风湿关节炎; 基因多态性; 白细胞介素 -17A; 白细胞介素 -38; 类风湿因子

中图分类号: R593.22; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 03-019-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2021.03.005

Study on the Correlation between rs2275913 Polymorphism of IL-17A Gene and Serum IL-17A and IL-38 Expression in Patients with Rheumatoid Arthritis in Shenzhen Area

LEI Ming-ling¹, PENG Chang-ji², ZHANG Yi-peng¹, YANG Hai-shan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Longhua District Central Hospital, Guangdong Shenzhen 518110, China;

2. Nanwan Institute of Shenzhen Longgang District Prevention and Health Care, Guangdong Shenzhen 518114, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between rs2275913 polymorphism of IL-17A gene and the expression of IL-17A and IL-38 in serum of patients with rheumatoid arthritis in Shenzhen Area. **Methods** 103 patients with RA were selected as the RA group, and another 116 patients without RA were selected as the control group. The levels of IL-17A, IL-38 and RF were detected respectively, and the polymorphism of IL-17A gene rs2275913 was analyzed. **Results** The levels of IL-17A and RF (54.06 ± 1.87 pg/ml and 29.65 ± 4.02 IU/ml) in RA group were significantly higher than (33.29 ± 1.42 pg/ml and 5.27 ± 1.38 IU/ml) in control group, while the levels of IL-38 (40.92 ± 8.67 pg/ml) were significantly lower than (53.78 ± 12.04 pg/ml) in control group, with statistical significance ($t=7.2065, 18.2972, 5.0197$, all $P<0.05$). The levels of IL-17A and RF increased with the increase of disease activity in RA group, while the levels of IL-38 were significantly decreased ($F=12.5271, 7.9351, 9.2702$, all $P<0.05$). The detection rate of AA genotype and A allele at rs2275913 of IL-17A gene in RA group (47.57% and 63.11%) was significantly higher than in control group (15.52% and 30.60%), and the difference was statistically significant ($\chi^2=5.9256, 4.0272$, all $P<0.05$). The level of IL-17A in AA genotype in RA group was significantly higher than that in AG and GG genotype, while the level of IL-38 was significantly lower, and there was statistically significant difference among different genotypes ($F=7.0625, 5.1873$, all $P<0.05$), but there was no statistically significant difference in the level of RF among different genotypes ($F=1.0961, P=0.1205$). Spearman correlation analysis showed that the level of IL-17A in RA patients was positively correlated

with the level of RF, but negatively correlated with the level of IL-38 ($r=0.5012, -0.6924$, all $P<0.05$). **Conclusion** The level of IL-17A increased significantly in RA patients, and increased with the severity of RA disease activity. At the same time, rs2275913 polymorphism of IL-17A gene was related to the susceptibility to RA in Shenzhen Area, and AA genotype may be one of the risk genes for RA.

Keywords: rheumatoid arthritis; gene polymorphism; interleukin -17A; interleukin -38; rheumatoid factors

类风湿关节炎 (rheumatic arthritis, RA) 是以侵蚀性关节炎为主要病变的一种全身慢性自身免疫性疾病, 主要表现为关节炎、滑膜 T 细胞浸润及滑膜增生, 并伴有软骨和骨的侵蚀及渐进性关节破坏, 其致畸和致残率高, 严重影响人们健康和生活质量^[1-2]。但 RA 发病机制至今不明, 有研究表明, RA 发病可能与炎性细胞因子产生有关, 其中白介素 -17 (IL-17) 是辅助性 T 细胞 17 (Th17) 分泌的一种主要效应因子, 能诱发并促进炎症发生, 与 RA 发生和发展有关^[3-5]。IL-38 是最近新发现的一种抑炎因子, 与 IL-36 受体结合, 能抑制 Th17 相关细胞因子如 IL-17, IL-22 等的合成, 在自身免疫性关节炎中发挥抗炎作用^[6-8]。同时研究表明, IL-17 基因单核苷酸多态性可影响 IL-17 的产生而与多种自身免疫性疾病有关, 其中 IL-17F 基因多态性与 RA 发病相关性已见报道^[9], 但 IL-17A 基因多态性与 RA 发病相关性未见报道, 且基因多态性分布具有区域和种族性差异。为此, 本研究对深圳地区 103 例 RA 患者和 116 例非 RA 健康人群 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与血清中 IL-17A, IL-38 水平表达的相关性进行了对比分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2019 年 2 月~2020 年 10 月在深圳市龙华区中心医院确诊的 RA 患者 103 例, 其中男性 27 例, 女性 76 例, 男:女为 1:2.81, 年龄 35~72 岁, 平均年龄 49.63 ± 12.75 岁。所有患者均符合 RA 诊断标准, 并根据 RA 疾病活动度评分标准 (DSA280)^[10] 进行分期, 其中轻度活动组 29 例 (DSA28<3.2), 中度活动组 56 例 (3.2<DSA28<5.1), 高度活动组 18 例 (DSA28>5.1)。纳入标准: ①符合 RA 诊断标准; ②初确诊者; ③未使用抗风湿药; ④医院伦理委员会同意批准; ⑤患者及家属知情同意。排除标准: ①伴有其他自身免疫性疾病者; ②病情加重者; ③伴有肿瘤、糖尿病及血液等疾病者; ④伴有严重器质性病变者; ⑤需采取非常规治疗者; ⑥怀孕及哺乳期妇女。选择同期非 RA 疾病的健康人群 116 例, 其中男性 31 例, 女性 85 例, 男:女为 1:2.74, 年龄 33~74 岁, 平均年龄 50.27 ± 13.52 岁, 均无自身免疫性疾病、骨及关节相关性疾病。确保两组的年龄、性别及男女比例等一般性资料差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 仪器与试剂 DXI800 全自动化学发光免疫分

析仪由美国 Bankman 公司提供; DNA 提取试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供; ABI7500 PCR 基因扩增仪由美国 ABI 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本采集: 于清晨空腹采集 5~6ml 静脉血, 其中 2~3ml 加入乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂) 抗凝管内上下充分颠倒混匀用于全血 DNA 提取, 剩余的加入无抗凝剂的一次性干燥管内, 30min 后分离血清用于 IL-17A, IL-38 及 RF 水平检测。

1.3.2 IL-17A, IL-38 及 RF 水平测定: 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中 IL-17A 和 IL-38 水平, RF 水平采用免疫比浊法进行检测, 所有操作均严格按照仪器和试剂盒说明书进行, 并由专人成批次检测, 确保结果的准确性和可比性。

1.3.3 全血 DNA 提取: 采用 DNA 提取试剂盒 (深圳亚能生物技术有限公司提供) 提取外周血中单个核细胞的基因组 DNA, 对合格的 DNA 提取标本用双蒸水稀释至 100ng/L, 于 -20℃ 冰箱内备用。

1.3.4 多态性分析: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法对 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性进行分析, 具体操作参照文献 [11]。

1.4 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5 软件, 计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 两组间比较采用 χ^2 检验, 多组间比较采用方差检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 IL-17A, IL-38 及 RF 水平比较 见表 1。RA 组 IL-17A 和 RF 水平比对照组明显升高, 而 IL-38 水平比对照组明显降低, 两组比较差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表 1 两组 IL-17A, IL-38 及 RF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	RA 组 (n=103)	对照组 (n=116)	t	P
IL-17A (pg/ml)	54.06 \pm 1.87	33.29 \pm 1.42	7.206 5	0.021 4
IL-38 (pg/ml)	40.92 \pm 8.67	53.78 \pm 12.04	5.019 7	0.028 5
RF (IU/ml)	29.65 \pm 4.02	5.27 \pm 1.38	18.297 2	0.008 1

2.2 RA 组不同活动度患者 IL-17A, IL-38 及 RF 水平比较 见表 2。RA 组随着病情活动度的加重 IL-17A 和 RF 水平明显升高, 而 IL-38 水平明显降低, 不同活动度间差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表2 RA组不同活动度患者IL-17A, IL-38及RF水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	轻度活动组 (n=29)	中度活动组 (n=56)	重度活动组 (n=18)	F	P
IL-17A (pg/ml)	38.29 ± 1.67	50.63 ± 1.95	89.11 ± 3.08	12.527 1	0.013 2
IL-38 (pg/ml)	51.76 ± 10.23	39.80 ± 6.82	26.39 ± 3.04	9.270 2	0.019 5
RF (IU/ml)	21.48 ± 2.93	30.75 ± 4.82	41.39 ± 6.13	7.935 1	0.027 4

2.3 两组IL-17A基因rs2275913位点基因型和等位基因检出率比较 见表3。RA组IL-17A基因rs2275913位点AA基因型和A等位基因检出率比对照组明显升高, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 RA组不同基因型患者IL-17A, IL-38及RF水平比较 见表4。RA组AA基因型IL-17A水平比AG和GG基因型明显升高, 而IL-38水平明显降低, 不同基因型之间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 但不同基因型RF水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表4 RA组不同基因型患者IL-17A, IL-38及RF水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	GG (n=22)	GA (n=32)	AA (n=49)	F	P
IL-17A (pg/ml)	39.21 ± 1.54	44.41 ± 1.72	67.02 ± 2.95	7.0625	0.0253
IL-38 (pg/ml)	52.71 ± 11.02	47.06 ± 9.35	31.69 ± 4.13	5.1873	0.0329
RF (IU/ml)	30.25 ± 4.16	28.74 ± 3.71	31.07 ± 5.29	1.0961	0.1205

2.5 RA组IL-17A与IL-38, RF水平相关性分析 RA组IL-17A和RF水平明显升高, 而IL-38水平明显降低, 经Spearman相关性分析, 结果显示RA组血清中IL-17A与RF水平呈正相关 ($r=0.5012, P < 0.05$), 而与IL-38水平呈负相关 ($r=-0.6924, P < 0.05$)。

3 讨论

IL-17主要由活化的T细胞产生诱导炎症反应的一种早期启动因子, 与受体结合后, 可通过丝裂原活化蛋白(MAP)激酶和核转录因子kB(nuclearfactor kB, NF-kB)途径促进T细胞激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生IL-6, IL-8, 粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、化学增活素及细胞黏附分子1(cellular adhesion molecule 1, CAM-1)等多种细胞因子, 从而导致炎症产生。另外, IL-17还可通过促进释放前炎症细胞因子来放大炎症反应。有研究表明, IL-17与RA的发生和发展有密切关系, 甚至发挥了至关重要的作用^[4-5,12]。RF是一种抗人或动物IgG分子Fc片段抗原决定簇的自身抗体, 与体内变性结合形成免疫复合物是导致自身免疫骨关节损伤的主要病理基础, 与关节、骨侵蚀及关节外表现发病有一定关系, 可作为评价RA病情与预后的一个重要指标, 是诊断RA最早的血清学指标^[13]。IL-38是IL-1家族成员之一, 可与IL-1R1, IL-36R

表3 两组IL-17A基因rs2275913位点基因型和等位基因检出率比较[n(%)]

基因类别	RA组 (n=103)	对照组 (n=116)	χ^2	P
基因型				
GG	22 (21.36)	63 (54.31)	4.862 3	0.027 9
GA	32 (31.07)	35 (30.17)	1.178 2	0.116 5
AA	49 (47.57)	18 (15.52)	5.925 6	0.025 1
等位基因				
G	76 (36.89)	161 (69.40)	3.703 5	0.031 4
A	130 (63.11)	71 (30.60)	4.027 2	0.025 1

及类IL-1R辅助蛋白1(IL-1RAPL1)结合, 可通过抑制NF-kB, 丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)及磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)等下游信号通路, 抑制许多炎症因子产生而发挥抑炎作用。同时IL-38可调节巨噬细胞和树突状细胞, 继而抑制Th17细胞反应。此外, IL-38还可调控滑膜成纤维细胞, 抑制骨质破坏与血管生成。有研究表明, IL-38在RA的发生和发展过程中具有重要的抑炎作用^[14-15]。本研究结果显示, RA组IL-17A和RF水平明显升高, 且随着病情活动度加重而明显上升, 与有关文献^[3-4,13]报道基本一致, 这表明IL-17A在RA的发生和发展过程中扮演着重要的促炎角色, 可能是促进RA炎症反应的重要触发因子, 从而引起RF水平升高。而IL-38水平明显降低, 与张继云等^[7]报导的基本一致, 而与肖盼盼等^[4]报导的不同, 这可能与不同机构所收集的RA患者病情严重程度不同有关, 但IL-38水平随病情活动度加重而明显下降的结论基本一致, 这表明了在RA发生和发展过程中IL-38水平降低会导致其对炎症的抑制作用减弱, 从而导致促炎因子大量产生, 加速疾病的进程。此外, 结果还显示, RA组IL-17A与RF水平呈正相关, 而与IL-38水平呈负相关, 这可能与IL-17A的促炎和IL-38的抑炎互相作用有关。

RA病因与发病机制目前尚不完全清楚, 多数

研究者认为RA发病是遗传与环境因素共同作用的结果。随着分子生物学技术不断深入研究发现,多种细胞因子基因多态性可增加RA发病风险,与RA的发生和发展有密切关系^[16-17]。IL-17A位于一个与RA相关的基因组区域的染色体6p12上,其基因多个位点存在多态性。有研究表明,IL-17A基因位点多态性与RA发病有关,且存在区域和种族性差异,如LEE等^[18]研究发现高加索人RA患者与健康人群IL-17A基因rs2275913位点基因型及等位基因频率存在明显差异,与RA发病有密切关系,而DHAOUADI等^[19]研究发现与突尼斯地区RA易感性缺乏相关性。本研究结果显示,深圳地区RA患者IL-17A基因rs2275913位点AA基因型和A等位基因检出率比健康人群明显升高,这表明IL-17A基因rs2275913位点多态性与深圳地区RA发病有一定相关性。同时AA基因型RA患者IL-17A水平明显升高,而IL-38水平明显降低,这可能与IL-17A基因rs2275913位点多态性能提高IL-17,其他促炎细胞因子及趋化因子表达水平,进而抑制抑炎因子水平及功能等有关。

综上所述,RA患者IL-17A和RF水平明显升高,而IL-38水平明显降低,且与病情的活动度有密切关系,加强IL-17A,RF和IL-38水平检测对RA的诊断及严重程度的判别诊断具有重要的参考价值。同时IL-17A基因rs2275913位点多态性与深圳地区RA发病易感性具有相关性,其中AA基因型可能是该地区RA发病的易感危险基因之一。

参考文献:

- [1] 白健,赵言鹏,王仁一,等.白细胞介素-17基因多态性与类风湿关节炎易感性关系Meta分析[J].陕西医学杂志,2021,50(1):117-122.
BAI Jian,ZHAO Yanpeng,WANG Renyi,et al. Relationship between interleukin(IL)-17 gene polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis[J]. Shaanxi Medical Journal,2021,50(1):117-122.
- [2] 王娟,马飞艳,樊萍.血清ASM与GPx水平检测与类风湿性关节炎膝关节病变的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2020,35(4):61-64.
WANG Juan,MA Feiyan,FAN Ping. Study on the relationship between serum levels of ASM and GPx, and rheumatoid arthritis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2020,35(4):61-64.
- [3] 周心怡,骆耐香.Th17细胞及其相关细胞因子在类风湿性关节炎中的作用[J].国际免疫学杂志,2018,41(2):217-221.
ZHOU Xinyi,LUO Naixiang. Roles of Th17 cells and related cytokines in rheumatoid arthritis [J]. International Journal of Immunology,2018,41(2):217-221.
- [4] 肖盼盼,付冰冰,孙雪茜,等.IL-38和IL-17在类风湿性关节炎中的表达水平及临床意义[J].湖北民族学院学报(医学版),2019,36(1):35-37.48.
XIAO Panpan,FU Bingbing,SUN Xueqian,et al. Expression levels and clinical significance of IL-38 and IL-17 in rheumatoid arthritis [J]. Journal of Hubei University for Nationalities (Medical Edition),2019,36(1):35-37,48.
- [5] 李鑫,蔡雄,刘良.Th17细胞在类风湿关节炎发病机制中的作用研究进展[J].中国药理学通报,2020,36(3):309-312.
LI Xin,CAI Xiong,LIU Liang. Research advances of roles of Th17 cells in pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Chinese Pharmacological Bulletin,2020,36(3):309-312.
- [6] 韩秋忆,张焱,陈广洁.IL-38及其与类风湿性关节炎关系的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(4):365-369.
HAN Qiuyi,ZHANG Yan,CHEN Guangjie. Research progress of IL-38 and its relationship with rheumatoid arthritis[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology,2020,36(4):365-369.
- [7] 张继云,赵旌,王梅,等.白细胞介素-38对类风湿关节炎患者辅助性T细胞17的调控[J].中华风湿病学杂志,2018,22(12):824-827.
ZHANG Jiyun,ZHAO Jing,WANG Mei,et al. T helper 17 cell in patients with rheumatoid arthritis mediated by interleukin-38 [J]. Chinese Journal of Rheumatology,2018,22(12):824-827.
- [8] 柴雨森,王川江,林时辉,等.白细胞介素-38的炎症免疫作用及调控机制研究进展[J].中国免疫学杂志,2019,35(2):230-235.
CHAI Yusen,WANG Chuanjiang,LIN Shihui,et al. Research progress of inflammatory immunity and regulation mechanism of interleukin-38 [J]. Chinese Journal of Immunology,2019,35(2):230-235.
- [9] 邓燕群,刘翠玉,尹志华,等.类风湿关节炎患者血清中IL-17表达及IL-17F基因位点rs763780多态性分析[J].中国免疫学杂志,2020,36(2):222-225.
DENG Yanqun,LIU Cuiyu,YIN Zhihua,et al. Expression of IL-17 in serum and polymorphism analysis of IL-17 F gene locus rs763780 in patients with rheumatoid arthritis [J]. Chinese Journal of Immunology,2020,36(2):222-225.
- [10] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2010, 69(9): 1580-1588.
- [11] 孙先琳,刘华君,伏伶.白细胞介素17A rs2275913基因多态性与儿童哮喘的相关性分析[J].华南国防医学杂志,2019,33(11):760-763.
SUN Xianlin,LIU Huajun,FU Ling. Correlation analysis of interleukin-17A rs2275913 gene polymorphism and childhood asthma [J]. Military Medical Journal of South China,2019,33(11):760-763.
- [12] 王婷婷,单超,赵今.白细胞介素-17基因多态性与牙周炎和类风湿性关节炎相关性研究进展[J].新乡医学院学报,2020,37(5):498-501.