

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.1910068

论著·临床研究

IL-8 基因 rs4073 位点多态性与新生儿败血症易感性的关系

赵晓芬 朱双燕 胡浩 和灿琳 张焱 李杨方 吴玉芹

(昆明市儿童医院新生儿科, 云南昆明 650228)

[摘要] **目的** 采用前瞻性研究方法探讨白细胞介素-8 (IL-8) 基因 rs4073 位点多态性与足月新生儿败血症易感性的关系。**方法** 选取 2017 年 1~12 月通过血培养阳性确诊为败血症的新生儿 50 例为败血症组; 有临床症状但血培养阴性的 50 例新生儿为临床败血症组; 另选取同期 50 例非感染新生儿作为对照组。采用测序技术检测 IL-8 基因 rs4073 位点多态性, 比较 3 组间基因型和等位基因频率的分布差异; 采用多因素 logistic 回归分析 IL-8 基因 rs4073 位点基因型与足月新生儿败血症易感性的关系。**结果** IL-8 基因 rs4073 位点基因型及等位基因频率的分布在 3 组间比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。logistic 回归分析显示低胎龄和 IL-8 基因 rs4073 位点 TT 基因型可能是新生儿败血症发病的危险因素 ($P<0.05$)。**结论** IL-8 基因 rs4073 位点 TT 基因型可能与足月新生儿败血症易感有关。
[中国当代儿科杂志, 2020, 22(4): 323-327]

[关键词] 败血症; 白细胞介素-8; 基因多态性; 新生儿

Association between interleukin-8 rs4073 polymorphisms and susceptibility to neonatal sepsis

ZHAO Xiao-Fen, ZHU Shuang-Yan, HU Hao, HE Can-Lin, ZHANG Yan, LI Yang-Fang, WU Yu-Qin. Department of Neonatology, Kunming Children's Hospital, Kunming 650228, China (Wu Y-Q, Email: wuyuqin@etyy.cn)

Abstract: Objective To study the association between interleukin-8 (IL-8) rs4073 polymorphisms and susceptibility to sepsis in full-term neonates through a prospective study. **Methods** A total of 50 neonates who were diagnosed with sepsis based on positive blood culture from January to December 2017 were enrolled as the sepsis group. Fifty neonates who had clinical symptoms and negative blood culture were enrolled as the clinical sepsis group. Fifty neonates without infection were enrolled as the control group. Sequencing was used to detect the polymorphisms of IL-8 rs4073. The three groups were compared in terms of the frequencies of genotypes and alleles. A multivariate logistic regression analysis was used to investigate the association of IL-8 rs4073 genotypes with sepsis in full-term neonates. **Results** There were significant differences in the frequencies of genotypes and alleles at IL-8 rs4073 among the three groups ($P<0.05$). The logistic regression analysis showed that a low gestational age and TT genotype at IL-8 rs4073 were risk factors for the pathogenesis of sepsis in neonates ($P<0.05$). **Conclusions** The full-term neonates with TT genotype at IL-8 rs4073 may be susceptible to sepsis.
[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(4): 323-327]

Key words: Sepsis; Interleukin-8; Gene polymorphism; Neonate

新生儿败血症是由微生物病原体侵入正常的无菌组织引起的新生儿炎症反应, 是导致新生儿死亡的主要原因, 在新生儿感染性疾病中居首位^[1-2]。足月儿发病率大约为 0.1%, 但病死率可达 20%^[3]。

白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 属于 CXC

趋化因子家族, 是前炎症因子之一, 主要由单核-巨噬细胞和内皮细胞等产生, 感染后诱导中性粒细胞趋化, 在炎症反应的发病机制中起着重要作用。在正常情况下 IL-8 含量很低, 而且不受胎龄和出生时间的影响。最近的研究^[4-5]表明, 遗传因素

[收稿日期] 2019-10-15; [接受日期] 2020-02-15

[基金项目] 云南省卫生科技计划项目 (2016NS131)。

[作者简介] 赵晓芬, 女, 硕士, 副主任医师。

[通信作者] 吴玉芹, 女, 主任医师。Email: wuyuqin@etyy.cn。

可能参与了败血症的发展过程,遗传变异可能对宿主免疫、易感性和败血症结局产生影响。许多学者在不同的病理条件下对 IL-8 的基因多态性与败血症进展的可能性之间的关系进行了研究,推测其与败血症的易感性或保护性有关^[6-8]。有研究表明 IL-8 基因 rs4073 位点多态性可能导致血清中 IL-8 浓度增加,从而引起和扩大炎症反应^[9]。因此,本课题组采用前瞻性研究方法,选择 IL-8 基因 rs4073 位点多态性在新生儿败血症中进行病例对照研究,采用测序技术检测 IL-8 基因 rs4073 位点多态性,以探讨 IL-8 基因多态性与新生儿败血症的易感性及临床相关性,为预测预后提供新的诊断工具。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1~12 月在昆明市儿童医院新生儿科住院的足月新生儿(胎龄 ≥ 37 周且 <42 周),有临床症状、体征,且血培养阳性的 50 例患儿为败血症组,如血培养结果系条件致病菌,则须在其他部位培养出同种细菌;有临床表现,血培养阴性并具有非特异性检查结果阳性 ≥ 2 项的 50 例患儿为临床败血症组,诊断标准依照中华医学会儿科学分会新生儿学组 2003 年提出的《新生儿败血症诊疗方案》^[10]。另选取 50 例同期住院的非感染足月新生儿为对照组,包括咽下综合征、非感染性腹泻、轻度非溶血性黄疸患儿,产前、产时无感染相关危险因素,无任何临床症状,实验室检查相关感染指标无异常。排除标准:

(1)合并严重先天畸形(如消化道畸形和先天性心脏病等);(2)合并遗传代谢性疾病。本研究获得我院伦理委员会的批准(2016-03-012-K01),所有患儿家长均已签署知情同意书。收集各组患儿基本资料,包括胎龄、日龄、性别、出生体重、分娩方式。

1.2 实验室检查及 DNA 提取

各组患儿均在入院时完善血常规、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、降钙素原(PCT)及血培养等实验室检查。用 EDTA 抗凝管采集静脉血 2 mL, -80°C 冰箱保存。使用 Wizard Genomic DNA Purification Kit(美国 Promega 公司),按 DNA 试

剂盒的操作说明提取 DNA。分光光度计定量,琼脂糖凝胶电泳质检,质检合格的 DNA 将浓度调整到 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$,转移至 384 孔板, -20°C 储存备用。

1.3 引物设计

使用 Genotyping Tools 及 MassARRAY Assay Design 软件设计并合成 IL-8 基因 rs4073 位点的 PCR 扩增引物及单碱基延伸引物。IL-8 rs4073 上游引物: 5'-ACGTTGGATGCTGAAGCTCCACAATTTGGT-3', 下游引物: 5'-ACGTTGGATGGCCACTCTAGTACTATATCTG-3'; 单碱基延伸上游引物: 5'-CACAATTTGGTGAATTATCAAA-3', 下游引物: 5'-CACAATTTGGTGAATTATCAAT-3'。

1.4 PCR 扩增及 PCR 产物碱性磷酸酶处理

PCR 扩增采用多重 PCR 技术,在 384 孔板中进行,每个反应体系总体积为 $5\ \mu\text{L}$: DNA $1\ \mu\text{L}$ 、 $10\times$ buffer $0.5\ \mu\text{L}$ 、 MgCl_2 ($25\ \text{mmol}/\text{L}$) $0.4\ \mu\text{L}$ 、dNTPmix ($25\ \text{mmol}/\text{L}$) $0.1\ \mu\text{L}$ 、PCR primermix $1\ \mu\text{L}$ 、HotStarTaq 酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.1\ \mu\text{L}$,加双蒸水至 $5\ \mu\text{L}$ 。扩增条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 20 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 45 个循环; 72°C 再延伸 3 min。将 PCR 产物用虾碱性磷酸酶(SAP)处理,以去除体系中游离的 dNTPs。

1.5 单碱基延伸及树脂纯化

在 SAP 处理结束后,进行单碱基延伸反应,反应体系总体积为 $9\ \text{mL}$: 单碱基延伸引物混合物 $0.9\ \mu\text{L}$, iPlex bufferplus $0.2\ \mu\text{L}$, iPlex terminator $0.2\ \mu\text{L}$, iPlex enzyme $0.04\ \mu\text{L}$, SAP 处理后 PCR 产物 $7\ \mu\text{L}$,加双蒸水至 $9\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 30 s; 94°C 5 s, 52°C 5 s, 80°C 5 s, 52°C 5 s, 4 个循环; 94°C 5 s, 52°C 5 s, 80°C 5 s, 39 个循环; 72°C 延伸 3 min。将延伸产物及水放到已准备好的树脂板中,封膜,离心 30 min 使树脂沉入孔底部。

1.6 芯片点样

启动 MassARRAYNanodispenser RS1000 点样仪,将树脂纯化后的延伸产物移至 384 孔 SpectroCHIP(美国 Sequenom 公司)芯片上。

1.7 质谱检测

将点样后的 SpectroCHIP 芯片使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱系统(MALDI-TOF)分析,检测结果使用 TYPER 4.0 软件分型并输出结果。

1.8 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。各组 IL-8 基因 rs4073 位点基因型分布采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验。符合正态分布计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 不符合正态分布计量资料采用中位数 (四分位间距) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 组间两两比较采用 Nemenyi 法。计数资料采用百分率 (%) 表示, 组间比较采用卡方检验, 若 $1 \leq$ 理论频数 < 5 , 使用连续校正卡方检验。应用 logistic 回归分析 IL-8 基因多态性 (T/A) 与新生儿败血症

的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

3 组患儿胎龄、日龄、出生体重、性别及分娩方式比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。同时对 3 组新生儿实验室非特异性指标进行比较, 败血症组及临床败血症组 CRP 及 PCT 水平均高于对照组, 败血症组 CRP 及 PCT 水平均高于临床败血症组 ($P < 0.05$), WBC 及 PLT 水平在 3 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 各组患儿临床资料比较

组别	例数	胎龄 ($\bar{x} \pm s$, 周)	日龄 ($\bar{x} \pm s$, d)	出生体重 ($\bar{x} \pm s$, g)	性别 [例 (%)]		分娩方式 [例 (%)]	
					男	女	顺产	剖宫产
对照组	50	38.7 ± 1.1	9 ± 8	3015 ± 750	22(44)	28(56)	37(74)	13(26)
临床败血症组	50	38.8 ± 1.2	12 ± 8	3040 ± 935	24(48)	26(52)	38(76)	12(24)
败血症组	50	38.6 ± 1.1	8 ± 6	3311 ± 495	27(54)	23(46)	34(68)	16(32)
F/χ^2 值		1.791	0.852	3.069	2.034		1.746	
P 值		0.172	0.737	0.059	0.361		0.418	

表 2 各组患儿实验室非特异性指标比较

组别	例数	WBC ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	PLT ($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	CRP [$M(P_{25}, P_{75})$, mg/L]	PCT [$M(P_{25}, P_{75})$, ng/mL]
对照组	50	11 ± 4	327 ± 103	0.5(0.5, 0.9)	0.3(0.2, 0.3)
临床败血症组	50	13 ± 9	316 ± 143	32.8(8.6, 87.7) ^a	5.6(0.3, 50.4) ^a
败血症组	50	12 ± 9	290 ± 134	40.3(12.7, 95.6) ^{ab}	43.0(9.1, 100.0) ^{ab}
F/H 值		3.492	4.107	83.682	85.620
P 值		0.103	0.142	<0.05	<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与临床败血症组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各位点基因型频率及等位基因频率与新生儿败血症易感性的相关性

对照组、临床败血症组和败血症组 IL-8 基因 rs4073 位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg

遗传平衡定律 (分别 $\chi^2 = 0.472, 0.794, 1.158$, $P > 0.05$)。IL-8 基因 rs4073 位点各基因型及等位基因频率在 3 组中的分布比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 IL-8 rs4073 位点基因型及等位基因在各组中的分布情况 [例 (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		TT	TA	AA	T	A
对照组	50	11(22)	26(52)	13(26)	48(48)	52(52)
临床败血症组	50	17(34)	23(46)	10(20)	57(57)	43(43)
败血症组	50	19(38)	29(58)	2(4)	67(67)	33(33)
χ^2 值		10.674			7.386	
P 值		0.028			0.024	

2.3 多因素 logistic 回归分析

将临床败血症组及败血症组患儿合并，以是否患有败血症为因变量，以胎龄、性别、日龄、出生体重、IL-8 基因 rs4073 位点多态性为自变量(自变量赋值见表 4)，应用多因素 logistic 回归分析新生儿败血症的危险因素，结果显示低胎龄是新生儿败血症发病的危险因素 ($P < 0.05$)，而性别、日龄、出生体重不是新生儿败血症发病的危险因素 ($P > 0.05$)；rs4073 位点 AA 基因型不是新生儿败血症发病的易感基因 ($P > 0.05$)，而 TT 基因型可能是新生儿败血症发病的易感基因 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 4 logistic 回归自变量赋值

自变量	对照组 (n=50)	败血症组 (n=100)	赋值
胎龄 (周)			
>39	24	47	0
≤ 39	26	53	1
性别			
男	22	51	0
女	28	49	1
日龄 (d)			
>7	23	59	0
≤ 7	27	41	1
出生体重 (g)			
>3 000	28	52	0
≤ 3 000	22	48	1
rs4073(T/A)			
TT	11	36	0
AT+AA	39	64	1
rs4073(T/A)			
AA	13	12	0
AT+TT	37	88	1

表 5 新生儿败血症危险因素 logistic 回归分析结果

变量	B	SE	Wald χ^2	OR	95%CI	P
胎龄	-0.463	0.160	8.424	0.6	0.460~0.860	0.003
性别	0	0.303	0	1.0	0.552~1.812	0.986
日龄	0.009	0.151	0.004	1.1	0.737~1.332	0.949
体重	-0.229	0.152	2.253	0.8	0.590~1.072	0.133
rs4073(TT)	-0.489	0.231	4.461	0.6	0.308~0.870	0.034
rs4073(AA)	0.467	0.279	2.801	1.6	0.666~3.663	0.094

3 讨论

新生儿败血症是一种危及生命的疾病，是新生儿发病和死亡的重要原因。识别基因变异可以预测败血症的易感性及结局，这有助于帮助我们识别那些有死亡高风险或严重并发症的患儿，需及时采取积极的治疗。本研究探讨了 IL-8 基因多态性与新生儿败血症的易感性，结果显示 IL-8 rs4073 位点基因型 AA 与新生儿败血症发生风险无明显相关性，而基因型 TT 可能是新生儿败血症的易感基因。同时，实验室检查非特异性指标 hsCRP 及 PCT 升高明显，符合临床败血症诊断的非特异性指标升高条件之一^[10]。

IL-8 是趋化因子家族的成员之一，其显著特点是中性粒细胞和淋巴细胞的趋化特性，启动和

扩大急性炎症反应，以及作为前炎症细胞因子在慢性炎症过程中发挥重要作用^[8]。IL-8 基因位于 4q13-21，含 4 个外显子、3 个内含子和 1 个近侧启动区^[11]。rs4073 位点在 IL-8 的启动子区域，其 T/A 基因型可影响 IL-8 启动子区转录活性^[12]和 IL-8 蛋白的表达。不同疾病 IL-8 基因多态性与各种疾病的易感风险不一。多项研究表明，IL-8 基因多态性可能是慢性牙周炎^[13]、幽门螺杆菌感染的相关性胃病^[14]、细菌性脑膜炎^[15]、口腔癌^[16]、乳腺癌^[17]等的危险因素。Amaya 等^[12]研究发现纯合子 TT 基因型的患者表达更高水平的 IL-8 蛋白。Li 等^[18]发现 IL-8 rs4073 位点 AA 基因型明显增加急性胰腺炎的发病风险。Belopolskaya 等^[19]认为 IL-8 rs4073 位点等位基因 A 可能是脓毒血症的保护基因。Fontes 等^[15]对西班牙的成人细菌性脑膜

炎进行研究发现, IL-8 rs4073 位点等位基因 T 通过减少白细胞的聚集, 降低清除病原菌的能力, 从而参与了炎症的进程。意大利学者 Esposito 等^[20]对 101 例血培养阳性和 100 例有临床症状但血培养阴性的早产儿研究发现, IL-8 基因多态性 rs4073 位点基因型 AT 和早产儿败血症的严重性相关, 通过血液中脂多糖刺激, 增加 IL-8 的产生, 启动和扩大炎症过程中发生的反应, 也与严重呼吸道感染有关^[9]。Hu 等^[8]对中国人的研究结果显示 IL-8 基因 rs4074 位点基因型与成人脓毒血症无相关性, 而本研究是针对足月新生儿人群, 结果显示 IL-8 rs4073 位点 TT 基因型与新生儿败血症的发病有相关性, 可能是其易感基因, 与 Amaya 等^[12]研究结果相一致。败血症的发病机制复杂, 涉及病原菌、环境暴露、宿主的免疫状态及多方面因素的相互作用。同时, 不同地域、不同人群、不同种族的基因多态性存在显著差异。

综上, 本研究对 IL-8 基因位点 rs4073 多态性与足月新生儿败血症的关系进行研究, 结果表明, 胎龄与新生儿败血症的发生有相关性; 出生体重、日龄、性别均不是足月新生儿败血症发生的危险因素, 其中出生体重不是新生儿败血症发生的危险因素可能与选择的研究对象均为足月儿有关; IL-8 基因 rs4073 位点基因型 TT 可能是足月新生儿败血症的易感基因。由于本研究样本量较小, 没有对败血症的严重程度分类; 其次是未对血清 IL-8 蛋白水平进行测定, 无法了解 IL-8 蛋白浓度与 IL-8 rs4073 位点基因型是否存在平行关系。因此需要扩大样本量, 对败血症的严重程度进行分类并完善 IL-8 蛋白浓度测定, 对评估新生儿败血症更有临床意义。

[参 考 文 献]

- [1] Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis[J]. *Lancet*, 2017, 390(10104): 1770-1780.
- [2] Lawn JE, Kerber K, Enweronu-Laryea C, et al. 3.6 million neonatal deaths - what is progressing and what is not?[J]. *Semin Perinatol*, 2010, 34(6): 371-386.
- [3] Shane AL, Stoll BJ. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes[J]. *J Infect*, 2014, 68(Suppl 1): S24-S32.
- [4] Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, et al. The pathogenesis of sepsis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 19-48.
- [5] Wang H, Wei Y, Zeng Y, et al. The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population[J]. *BMC Med Genet*, 2014, 15: 123.
- [6] Wacharasint P, Nakada TA, Boyd JH, et al. AA genotype of IL-8 -251A/T is associated with low PaO₂/FiO₂ in critically ill patients and with increased IL-8 expression[J]. *Respirology*, 2012, 17(8): 1253-1260.
- [7] Yousef AA, Suliman GA, Mabrouk MM. The value of admission serum IL-8 monitoring and the correlation with IL-8 (-251A/T) polymorphism in critically ill patients[J]. *ISRN Inflamm*, 2014, 2014: 494985.
- [8] Hu D, Wang H, Huang X, et al. Investigation of association between IL-8 serum levels and IL8 polymorphisms in Chinese patients with sepsis[J]. *Gene*, 2016, 594(1): 165-170.
- [9] Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families[J]. *Thorax*, 2000, 55(12): 1023-1027.
- [10] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华医学会中华儿科杂志编辑委员会. 新生儿败血症诊疗方案[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(12): 897-899.
- [11] Wang N, Zhou R, Wang C, et al. -251 T/A polymorphism of the interleukin-8 gene and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis based on 42 case-control studies[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(3): 2831-2841.
- [12] Amaya MP, Criado L, Blanco B, et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population[J]. *Int Endod J*, 2013, 46(1): 71-78.
- [13] Sippert EÂ, de Oliveira e Silva C, Visentainer JE, et al. Association of duffy blood group gene polymorphisms with IL8 gene in chronic periodontitis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83286.
- [14] Kumar S, Kumari N, Mittal RD, et al. Association between pro-(IL-8) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine variants and their serum levels and H. pylori-related gastric carcinogenesis in northern India[J]. *Meta Gene*, 2015, 6: 9-16.
- [15] Fontes FL, de Araújo LF, Coutinho LG, et al. Genetic polymorphisms associated with the inflammatory response in bacterial meningitis[J]. *BMC Med Genet*, 2015, 16: 70.
- [16] Singh PK, Chandra G, Bogra J, et al. Association of genetic polymorphism in the interleukin-8 gene with risk of oral cancer and its correlation with pain[J]. *Biochem Genet*, 2016, 54(1): 95-106.
- [17] Huang Q, Wang C, Qiu LJ, et al. IL-8-251A>T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(7): 1147-1150.
- [18] Li D, Li J, Wang L, et al. Association between IL-1 β , IL-8, and IL-10 polymorphisms and risk of acute pancreatitis[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6635-6641.
- [19] Belopolskaya OB, Smelaya TV, Moroz VV, et al. Clinical associations of host genetic variations in the genes of cytokines in critically ill patients[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 180(3): 531-541.
- [20] Esposito S, Zampiero A, Pugni L, et al. Genetic polymorphisms and sepsis in premature neonates[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101248.

(本文编辑: 万静)