

论著 · 临床研究

# TNF-α-308G/A 和 IL-6-174G/C 基因多态性与 呼吸道合胞病毒毛细支气管炎的相关性

张亚丽,董琳,陈小芳

(温州医学院附属育英儿童医院呼吸科,浙江 温州 325027)

**〔摘要〕** 目的 探讨肿瘤坏死因子(TNF)-α-308G/A、白细胞介素(IL)-6-174G/C 基因多态性与呼吸道合胞病毒((RSV) 毛细支气管炎易感性的关系。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性技术(PCR-RFLP)检测 150 例 RSV 毛细支气管炎患儿(病例组)和 120 例正常对照儿童(对照组)TNF-α-308G/A 和 IL-6-174G/C 的基因多态性。**结果** ①病例组 TNF-α-308 位点 GG、GA、AA 基因型频率分别为 68.0%、28.0%、4.0%,G、A 等位基因型频率分别为 82.0%、18.0%;对照组 TNF-α-308 位点 GG、GA、AA 基因型频率分别为 80.8%、19.2%、0,G、A 等位基因型频率分别为 90.4%、9.6%;两组基因型及等位基因频率差异有显著性意义,病例组 A 等位基因的频率明显高于对照组( $\chi^2=5.665,7.726$ ,均  $P<0.05$ );与 G 等位基因携带者相比,A 等位基因携带者患 RSV 毛细支气管炎的风险增加了 2.071 倍( $OR=2.071, P<0.05$ );②病例组和对照组 IL-6-174G/C 位点均只见 GG 基因型。**结论** TNF-α-308A 等位基因与 RSV 毛细支气管炎的易感性相关,其可能是影响 RSV 毛细支气管炎发病的一个重要候选基因;温州地区汉族儿童未发现 IL-6-174G/C 基因多态性。 [中国当代儿科杂志,2009,11(10):821-824]

**〔关键词〕** 呼吸道合胞病毒;毛细支气管炎;基因多态性;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-6;儿童

**〔中图分类号〕** R725.6 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2009)10-0821-04

## Association of tumor necrosis factor-α-308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphisms with the susceptibility of respiratory syncytial virus bronchiolitis

ZHANG Ya-Li, DONG Lin, CHEN Xiao-Fang. Department of Pulmonary, Yuying Children's Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Dong L, Email: donglin0728@vip.sina.com)

**Abstract: Objective** To study the association of tumor necrosis factor (TNF)-α-308G/A and interleukin (IL)-6 -174G/C gene polymorphisms with the susceptibility of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to identify the polymorphisms at position 308 of the TNF-α promoter and -174 of the IL-6 promoter in 150 children with RSV bronchiolitis and 120 healthy children (control group). **Results** The frequency of GG, GA and AA genotypes of TNF-α-308 was 68.0%, 28.0% and 4.0% respectively in the RSV group, while that was 80.8%, 19.2% and 0 respectively in the control group. There were significant differences in the genotype frequencies between the two groups ( $\chi^2=5.665, P<0.05$ ). The frequency of G and A alleles in the RSV group was 82.0% and 18.0% respectively, while that was 90.4% and 9.6% respectively in the control group. The frequency of A allele in the RSV group was significantly higher than that in the control group ( $\chi^2=7.726, P<0.05$ ). Compared to the children carrying G allele, the children with A allele demonstrated a 2.071-fold increased risk of RSV bronchiolitis ( $OR=2.071, P<0.05$ ). Only GG genotype was detected at position -174 of IL-6 in both groups. **Conclusions** TNF-α-308A is associated with the susceptibility of RSV bronchiolitis and it might be an important candidate gene for the development of RSV bronchiolitis. IL-6-174G/C gene polymorphism is not found in children in Wenzhou area. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10):821-824]

**Key words:** Respiratory syncytial virus; Bronchiolitis; Gene polymorphism; Tumor necrosis factor-α; Interleukin-6; Child

呼吸道合胞病毒(RSV)是世界范围内婴幼儿下  
呼吸道感染(LRTI)最常见的病原,可引起毛细支气  
管炎和肺炎,也是导致哮喘的重要原因,但发病机制  
尚不明了。肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素  
(IL)-6 作为重要的促炎细胞因子,广泛参与机体的  
炎症-免疫反应的调节。体外研究表明,RSV 感染

[收稿日期]2008-12-04;[修回日期]2009-02-13  
[基金项目]浙江省教育厅科研基金(20041071)。  
[作者简介]张亚丽,女,硕士,住院医师。主攻方向:小儿呼吸系统疾病。现工作单位为浙江省丽水市中心医院儿科。  
[通讯作者]董琳,女,主任医师,温州医学院附属育英儿童医院呼吸科,邮编:325027。

的上皮细胞能直接或间接地产生大量促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等,募集免疫细胞到炎症部位来调节炎症反应<sup>[1]</sup>。临床研究亦证实,RSV 毛细支气管炎患儿的鼻咽分泌物(NPS)和血清中存在高水平的 TNF- $\alpha$  和 IL-6<sup>[2,3]</sup>,而调节这些细胞因子表达的基因存在多态性。因此,这些促炎因子基因的个体差异可能在 RSV 毛细支气管炎的发病中发挥重要作用。2006 年 11 月至 2007 年 3 月,作者从 RSV 毛细支气管炎患儿外周血单个核细胞中提取 DNA,测定 TNF- $\alpha$ -308G/A 和 IL-6-174G/C 的单核苷酸多态性(SNP),并对其与 RSV 毛细支气管炎的易感性进行了研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

病例组为 2006 年 11 月至 2007 年 3 月首次入住本院呼吸科病房,临床诊断为毛细支气管炎<sup>[4]</sup>,经直接免疫荧光法检测鼻咽分泌物中 RSV 抗原确诊为 RSV 感染的患儿 150 例。男 111 例,女 39 例;年龄 1~24 个月,平均(6.99 $\pm$ 4.24)个月;均为汉族儿童。有早产、双胎、先天性心脏病、支气管肺发育不良、免疫缺陷等基础疾病的患儿除外。对照组选择同期在本院健康体检的儿童 120 例。男性 92 例,女性 28 例;年龄 2~24 个月,平均(7.89 $\pm$ 3.63)个月。既往均无毛细支气管炎病史,无特应性疾病史(包括哮喘、特应性鼻炎及特应性皮炎等),亦无家族特应性病史。两组性别和年龄比较差异均无显著性( $P>0.05$ )。本研究经本院学术伦理委员会讨论通过并获得家长知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患儿入院当日取静脉血 1 mL,加 EDTA 抗凝,-70℃冰箱保存,待提取模板 DNA。对照组标本的采集与处理同上。

1.2.2 模板 DNA 提取 Chelex-100 快速提取法:①取全血 150  $\mu$ L 加入到装有 1 mL 红细胞裂解液的 1.5 mL 离心管中,充分混匀,静置 10 min;②10 000 r/min 离心 3 min,弃上清,加 PBS 液 1 mL

洗 2 次;③沉淀加入 150  $\mu$ L 5% Chelex-100,充分混匀;④沸水浴 10 min,立即冰上冷却;⑤12 000 r/min 离心 3 min,取上清备用,-20℃保存。Chelex-100 由德国 Sigma 公司购得。

1.2.3 聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性技术(PCR-RFLP)检测 根据 TNF- $\alpha$  序列(NCBI GenBank 编号:AY214167)和 IL-6 序列(NCBI GenBank 编号:AF372214),利用 Primer 5.0 程序,设计两对引物。各位点信息、引物、产物长度、PCR 反应条件及限制性内切酶见表 1。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: Primer F(10  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, Primer R(10  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, dNTPMix(2 mmol/L)2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)1.6  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer 2  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(1 U/ $\mu$ L) 1.5  $\mu$ L, 去离子水 8.9  $\mu$ L。取 PCR 产物 5  $\mu$ L,限制性内切酶 3 U, 10 $\times$  Buffer 1  $\mu$ L,余用去离子水补齐,总体积为 10  $\mu$ L,37℃水浴箱中酶切过夜。30 g/L 琼脂糖凝胶鉴定基因型。

1.2.4 IL-6 测序分析 从病例组和对照组分别随机选取部分包含 IL-6-174G/C 位点的 PCR 扩增产物进行测序分析,PCR 产物纯化及测序分析由上海基康生物技术有限公司完成。

1.3 统计学分析

各位点病例组、对照组基因型与 Hardy-Weinburg 平衡吻合程度用卡方( $\chi^2$ )检验;病例组、对照组各 SNP 位点的基因型及等位基因频率用频数计数法计算;两组基因型及等位基因型频率的差异用 $\chi^2$ 检验计算;用 logistic 回归模型判断等位基因型对发病危险度的影响;以上均使用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析; $P<0.05$  认为差异有显著性。

2 结果

2.1 TNF- $\alpha$ -308G/A 基因型的判断

-308G 等位基因存在 NcoI 酶的酶切位点,GG 基因型扩增片段酶切产物为 123 bp 和 20 bp 2 个片段,GA 基因型为 123 bp、120 bp 和 20 bp 3 个片段,AA 基因型未被切开,20 bp 的片段在电泳过程中弥散而不可见(图 1)。

表 1 各位点的基本信息、引物、反应条件、产物长度及限制性内切酶

| 基因位点                      | 位置  | 突变碱基              | 引物                        | 产物长度   | 反应条件                                     | 内切酶     |
|---------------------------|-----|-------------------|---------------------------|--------|------------------------------------------|---------|
| TNF- $\alpha$<br>-308 G/A | 启动子 | G $\rightarrow$ A | F:AGGCAATAGCTTTTGAGGGcCAT | 143 bp | 94℃ 3 min; 94℃ 30 s                      | NcoI    |
|                           |     |                   | R:ACACACAAGCATCAAGGATACC  |        | 57℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 7 min   |         |
| IL-6<br>-174 G / C        | 启动子 | G $\rightarrow$ C | F:TCGTGCATGACTTCAGCTTT    | 400 bp | 94℃ 3 min; 94℃ 30 s                      | Hinf II |
|                           |     |                   | R:AGTTCATAGCTGGGCTCCTG    |        | 63.5℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32 个循环; 72℃ 7 min |         |

小写字母处引入错配碱基以形成 NcoI 酶的酶切位点

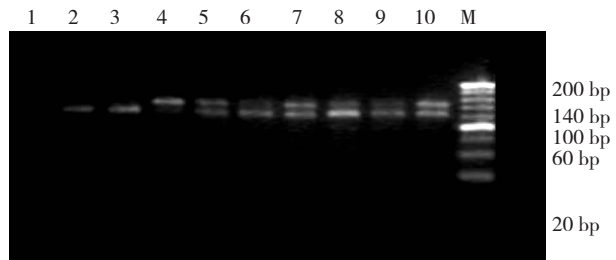


图1 TNF-α-308 G/A 位点 PCR-RFLP 电泳图谱  
M: DNA 分子质量标准;2、3 为 GG 纯合子;1、5、6、7、8、9、10 为 GA 杂合子;4 为 AA 纯合子

2.2 TNF-α-308G/A 单核苷酸多态性分析结果

TNF-α-308G/A 位点病例组和对照组基因型经 Hardy-Weinberg 平衡检验 ( $\chi^2 = 4.714, 4.662; P > 0.05$ ), 表明两组人群基因均来自同一孟德尔群体, 其分布在所调查的人群中已达到遗传平衡。病例-对照分析显示, 病例组和对照组基因型及等位基因型频率差异均有显著性意义, 病例组 A 等位基因的频率明显高于对照组 ( $\chi^2 = 5.665, 7.726, P < 0.05$ ) (表 2); 与 G 等位基因携带者相比, A 等位基因携带者患 RSV 毛细支气管炎的风险增加了 2.071 倍 ( $OR = 2.071, 95\% CI: 1.230 \sim 3.487, P < 0.05$ )。

2.3 IL-6-174 G/C 基因型判断

-174 位点处不存在 *Hin*I Ⅱ 的酶切位点, 故病例组和对照组该位点的基因型均为 GG 型; 但由于 PCR 扩增的该段序列中含有一个 *Hin*I Ⅱ 酶的天然酶切位点, 故该片段被切为 271 bp 和 129 bp 两个片段 (图 2), 测序结果与 PCR-RFLP 一致 (图 3), 本研究提示温州地区汉族儿童人群中未发现 IL-6-174 位点基因多态性。

| 表 2 TNF-α-308G/A 病例-对照研究结果 |     | 例(%)      |          |        |           |          |
|----------------------------|-----|-----------|----------|--------|-----------|----------|
| 组别                         | 例数  | 基因型频率     |          |        | 等位基因频率    |          |
|                            |     | GG        | GA       | AA     | G         | A        |
| 对照组                        | 120 | 97(80.8)  | 23(19.2) | 0(0)   | 217(90.4) | 23(9.6)  |
| 病例组                        | 150 | 102(68.0) | 42(28.0) | 6(4.0) | 246(82.0) | 54(18.0) |

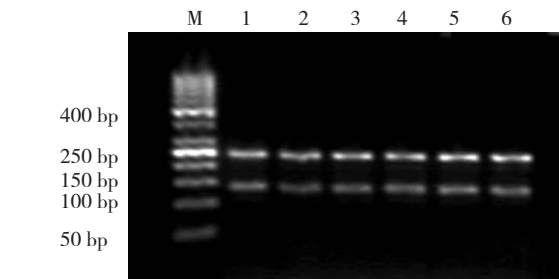


图2 IL-6-174 G/C 位点 PCR-RFLP 电泳图谱  
M: DNA 分子质量标准;1、2、3、4、5、6 均为 GG 纯合子

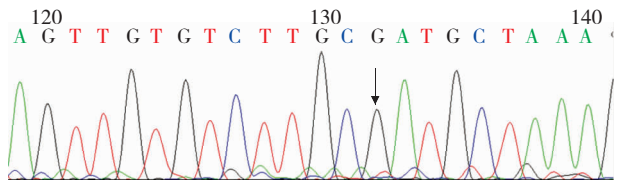


图3 IL-6-174GG 基因型 IL-6-174 位点基因型均为 GG 型。

3 讨论

TNF-α 作为一种重要的促炎细胞因子, 在哮喘气道炎症中的作用已得到证实。TNF-α 不仅有抗病毒活性; 而且由于其在炎症反应早期能趋化、激活大量的 T 细胞, 从而在 RSV 感染的免疫反应中发挥重要作用。另外, TNF-α 可通过诱导 IL-6 和 IL-8 等细胞因子的释放, 增加血栓素 A2 的活性及促进炎症细胞的粘附、浸润和游走等作用, 来诱发和加重 RSV 感染所致的气道炎症反应。既往研究显示, RSV 毛细支气管炎患儿血清中 TNF-α 水平明显升高<sup>[3]</sup>。

TNF-α 基因长约 2 676 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子, 与主要组织相容性复合体 (MHC) 基因紧密连锁, 位于 6 号染色体 HLA-DR 及 HLA-B 位点之间的 HLA-III 抗原基因簇, 即 6p21.3。TNF-α 基因存在多态性现象, 其多态性位点包括 -376、-308、-238、-163 和 70 位点 G→A 的碱基变化, -863 位点 C→A、-1031 位点 T→C, -857 及 -850 位点 C→T 的碱基变化。目前, 研究最多的多态性位点位于 TNF-α-308 位点, 该位点由 G→A 的突变造成了限制性内切酶 *Nco*I 的识别位点的缺失。Louis 等<sup>[5]</sup> 的研究证实, TNF-α-308 位点的突变影响其转录水平, TNF-α-308A 携带者的 TNF-α 产量增高。Schaaf 等<sup>[6]</sup> 亦发现, TNF-α-308A 等位基因型显著增强 TNF 的生物活性, -308A 与 TNF-α 诱导性和持续性高水平相关。最新研究表明, TNF-α 基因多态性与支气管哮喘的易感性相关<sup>[7]</sup>。

本研究发现, 病例组和对照组 TNF-α-308G/A 基因型分布均符合 Hardy-Weinburg 平衡, 表明两组人群来自同一孟德尔群体, 其基因型分布在所调查的人群中已达到了平衡。病例组 TNF-α-308A 等位基因频率明显高于对照组, 与 G 等位基因携带者相比, A 等位基因携带者患 RSV 毛细支气管炎的风险增加了 2.071 倍, 表明 TNF-α-308A 与 RSV 毛细支气管炎的易感性相关, 其可能是影响 RSV 毛细支气

管炎发病的一个重要候选基因。荷兰学者 Hoebee 等<sup>[8]</sup>曾对 TNF-308 位点基因多态性与 RSV 毛细支气管炎易感性的相关性进行了研究,但未发现二者的相关性。造成结果差异的原因,首先可能是种族的差异,其次可能是样本量的不同。

IL-6 是另一个重要的促炎细胞因子,在机体的免疫调节及炎症反应中发挥重要作用。RSV 毛细支气管炎患儿血清及 NPS 中 IL-6 水平明显增高<sup>[2,3]</sup>,提示其在 RSV 毛细支气管炎的炎症反应中亦发挥重要作用。人 IL-6 基因定位于 7p21,含 5 个外显子和 4 个内含子,全长 7 kb。IL-6 基因 5'端非编码区及 3'端均存在多态性,其中位于基因 5'端的 -174G/C、-597G/A、-572G/C 位点核苷酸的变异能影响 IL-6 的转录水平。波兰学者发现 IL-6-174G/C 位点核苷酸的变异能影响血浆 IL-6 的表达水平,并且与胰腺癌及慢性胰腺炎的发病有关<sup>[9]</sup>。美国学者 Gentile 等<sup>[10]</sup>则发现,IL-6-174 位点的基因型同 RSV-LRTI 患儿的住院时间和氧饱和度有关。而来自东亚的一些报道则发现中国、日本、韩国等东亚人群中可能不存在-174G/C 位点的多态性<sup>[11~13]</sup>。本研究采用 PCR-RFLP 方法对病例组 and 对照组患儿的 IL-6-174 位点进行检测,发现该位点的基因型均为 GG 型,为进一步验证此结果,又从两组患儿中随机选取一些标本进行 DNA 测序,结果同 PCR-RFLP 检测结果一致,提示在温州地区汉族儿童人群中未发现该位点的多态性。近来国内两篇分别关于 IL-6 基因多态性与肺癌和尘肺易感性的相关性研究亦发现 IL-6-174 位点基因型均为 GG 型<sup>[14,15]</sup>。因此,IL-6-174 位点基因多态性在中国人中是罕见的,造成此种差异的原因主要是种族的差异。由于本研究未对 IL-6 的其他 SNP 位点进行研究,所以尚不能对 IL-6 基因多态性与 RSV 毛细支气管炎的关系得出结论。

综上所述,本研究结果提示 TNF- $\alpha$ -308A 与 RSV 毛细支气管炎的易感性有关,其可能是影响 RSV 毛细支气管炎发病的一个重要候选基因。但 TNF- $\alpha$  基因多态性只能部分解释 RSV 毛细支气管炎的易感性,本课题组其他研究发现 RANTES-403A 等位基因、IL-8-251A 与 781C 等位基因形成的 AC 单体型均与 RSV 毛细支气管炎的易感性相关,这些易感基因相互之间是否存在联合或协同作用,目前尚不明了,有待今后进一步研究<sup>[16]</sup>。

[参 考 文 献]

[1] McNamara PS, Flanagan BF, Selby AM, Hart CA, Smyth TL.

Pro- and anti-inflammatory responses in respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. Eur Respir J, 2004, 23(1):106-112.

[2] Matsuda K, Tsutsumi H, Okamoto Y, Chiba C. Development of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha activity in nasopharyngeal secretions of infants and children during infection with respiratory syncytial virus[J]. Clin Diag Lab Immunol, 1995, 2(3):322-324.

[3] 董琳,李昌崇,黄达枢,陈小芳,蔡晓红,陈晓冰,等. IL-6,IL-8 及 TNF- $\alpha$  在呼吸道合胞病毒毛细支气管炎发病中的作用[J]. 浙江医学,1999,21(5):65-66.

[4] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社,2002,1199-1200.

[5] Louis E, Franchimont D, Prion A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 113(3):401-406.

[6] Schaaf BM, Seitzer U, Pravica V, Aries SP, Zabel P. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(2):379-382.

[7] Kumar V, Khosla R, Gupta V, Ssrin BC, Sehajpal PK. Differential association of tumour necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphism (-308) with tuberculosis and bronchial asthma[J]. Natl Med J India, 2008, 21(3):120-122.

[8] Hoebee B, Bont L, Rietveld E, van Oosten M, Hodemaekers HM, Naqelkerke NJ, et al. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor- $\alpha$  genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis[J]. J Infect Dis, 2004, 189(5):239-247.

[9] Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, Malecka-Panas E. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) gene polymorphism and IL-6 serum level in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(3):683-689.

[10] Gentile DA, Doyle WJ, Zeevi A, Howe-Adams J, Kapadia S, Trecki J, et al. Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with respiratory syncytial virus infection[J]. Hum Immunol, 2003, 64(3):338-344.

[11] Zhai R, Liu G, Yang C. The G to C polymorphism at -174 of the interleukin-6 gene is rare in Southern Chinese population[J]. Pharmacogenetics, 2001, 11(8):899-701.

[12] Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, et al. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density[J]. Hum Genet, 2001, 106(5):267-272.

[13] Lim CS, Zheng S, Kim YS, Ahn C, Han JS, Kim S, et al. The -174 G to C polymorphism of interleukin-6 gene is very rare in Koreans[J]. Cytokine, 2002, 19(10):52-54.

[14] 刘晓琳,李岩,梁婧,孙殿水,戴悦,曹邦伟. 白细胞介素-6 基因多态性与肺癌易感关联性的研究[J]. 中国肿瘤临床,2007,34(10):562-565.

[15] 范雪云,王欣荣,李翠兰,杨俊芬,刘艳红,王永恒,等. 白细胞介素-6 基因多态性与尘肺易感性的病例对照研究[J]. 中国职业医学,2007,34(3):199-201,204.

[16] 董琳,黄志英,陈小芳,周晓聪,李锦燕,林剑. INF- $\gamma$ /A + 874T 位点基因多态性与呼吸道合胞病毒毛细支气管炎的相关性[J]. 中国当代儿科杂志,2009,11(1):21-24.

(本文编辑:吉耕中)