

·论著·

白细胞介素-1 $\beta$ 基因多态性与新型甲型H1N1流感的关系杨辉<sup>1,2</sup>, 张国良<sup>2</sup>, 汪文斐<sup>2</sup>, 陈心春<sup>2</sup>, 郑学宝<sup>3</sup>, 吴爱武<sup>4\*</sup>

**摘要:**目的 探讨白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )基因单核苷酸多态性(SNP)与新型甲型H1N1流感易感性的关系。方法 针对IL-1 $\beta$ 基因5'端的4个SNP位点(rs1143623, rs1143639, rs16944, rs3917345),使用飞行时间质谱分析技术(TOF-MS)对167例H1N1流感组患者和192例健康对照组人群检测其基因多态性。结果 rs16944有A和G两种等位基因,H1N1组A等位基因频率为61.9%,对照组为49.5%,差异有统计学意义( $\chi^2=10.761$ ,  $P=0.001$ , OR=0.602, 95%CI 0.444~0.816); rs1143639有G和A两种等位基因,G等位基因频率在H1N1组中为95.5%,对照组为98.7%,差异也有统计学意义( $\chi^2=6.708$ ,  $P=0.0096$ , OR=3.564, 95%CI 1.281~9.917);其余两个位点在两组人群间无统计学意义。结论 rs16944和rs1143639位点与新型甲型H1N1流感易感性相关。

**关键词:** 白细胞介素-1 $\beta$ ; 单核苷酸多态性; 甲型H1N1流感; 飞行时间质谱分析技术  
**中图分类号:** R511.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)9-1055-04

The relationship between single nucleotide polymorphisms of IL-1 $\beta$  gene and susceptibility to influenza A (H1N1) virus. YANG Hui, ZHANG Guo-liang, WANG Wen-fei, et al. (Guangzhou Medical College, The Third People's Hospital of Shenzhen, Guangzhou, 510260, Guangdong, P. R. China; Corresponding author: WU Ai-wu, E-mail: pcgame509@foxmail.com)

**Abstract:** Objective To explore the association between IL-1 $\beta$  gene single nucleotide polymorphisms and the susceptibility influenza A (H1N1) virus. **Methods** Four SNPs(rs1143623, rs1143639, rs16944, rs3917345) were collected in IL-1 $\beta$  gene and genotyped with TOF-MS assay among influenza A (H1N1) groups(n=167) and healthy controls(n=192). **Results** rs16944 SNP involved A and G allele. The A allele frequency in H1N1 groups and healthy controls group were 61.9% and 49.5%, respectively, showing significant difference ( $\chi^2=10.761$ ,  $P=0.001$ , OR=0.602, 95% CI 0.444~0.816); rs1143639 SNP involved G and A allele, and the G allele frequency in H1N1 groups and healthy controls were 95.5% and 98.7%, also showing significant difference ( $\chi^2=6.708$ ,  $P=0.0096$ , OR=3.564, 95% CI 1.281~9.917); no significant difference was observed in allele frequency between H1N1 group and healthy control group for other SNPs. **Conclusion** rs16944 SNP and rs1143639 SNP of IL-1 $\beta$  gene were associated with susceptibility to influenza A (H1N1) virus.

**Key words:** Interleukin-1 $\beta$ ; Single nucleotide polymorphisms; Influenza A (H1N1) virus; Time-of-flight mass spectrometry

甲型H1N1流感是由甲型H1N1流感病毒引起的呼吸道传染病,从2009年3月美国和墨西哥甲型H1N1流感疫情爆发,到2010年1月底,在全球已造成至少12 799人死亡。而随着全球经历了2009年冬季甲流病毒传播高峰后,世界卫生组织于2010年8月宣布进入流感大流行后期<sup>[1]</sup>。目前已经明确,此次甲型H1N1流感病毒是猪流感病毒的一种新的变异株,包含有猪流感、禽流感、人流感三种流感病毒的基因片段,可以在人群之间传染,毒力较前有所增强<sup>[2-3]</sup>。通过对甲型H1N1流感病毒密切接触者进行回顾性调查发现,甲型H1N1流感感染存在个体差异,提示H1N1流感感染与个体遗传背景相关。

众所周知,甲型H1N1流感病毒感染机体后会出现一系列炎症反应,引起支气管和细支气管广泛变

性、坏死,腔内充满炎症细胞的渗出液<sup>[4]</sup>。白细胞介素-1(IL-1)是一种重要的前炎症细胞因子,在调节免疫应答和炎症反应中有重要作用,它的主要任务是对各种不同程度的损害起一定的保护作用,从微生物的定植到感染、恶性转化<sup>[5]</sup>。IL-1 $\beta$ 是IL-1家族的重要成员,同时也是前炎症免疫反应的主要诱导剂,通过与I型IL-1 $\gamma$ 结合启动级联反应,引起巨噬细胞、嗜中性粒细胞的招募与活化、血管扩张、发热等前炎症免疫反应<sup>[6]</sup>。现有研究结果表明,IL-1 $\beta$ 基因存在着基因变异及基因多态性,与胰腺神经肿瘤<sup>[7]</sup>、冠心病<sup>[8]</sup>、颅内动脉瘤<sup>[9]</sup>、血脂<sup>[10]</sup>、消化性溃疡<sup>[11]</sup>等疾病存在相关性,但其与甲型H1N1流感的相关性却少有研究。通过研究IL-1 $\beta$ 基因单核苷酸多态性(SNP)与甲型H1N1流感的相关性,从遗传基因层面来探讨甲型H1N1流感

基金项目 深圳市科技计划项目(No. 201002107);东莞市科技计划项目(No. 200910815229)。

作者单位 1.广州医学院 广东 广州 510182; 2.深圳市第三人民医院 广东 深圳 518112; 3.广东医学院 广东 东莞 523024; 4.广州医学院第一附属医院 广东 广州 510260

作者简介 杨辉(1988-),男,汉族,湖南永州市人,在读硕士研究生,主要从事病原微生物研究。

\*通讯作者 E-mail: pcgame509@foxmail.com

的发病机制。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 本次研究所选取的对象包括 167 例甲型 H1N1 流感病例和 192 例健康对照人员。前者为疫情暴发初期在深圳市第三人民医院接受住院隔离治疗的患者,其中男性 91 例,女性 76 例,平均年龄( $22.37 \pm 10.95$ )岁。后者为甲型 H1N1 流感疫情高峰期在深圳市第三人民医院体检科进行健康体检人员,其中男性 101 例,女性 91 例,平均年龄为( $22.53 \pm 10.29$ )岁,并且所有人员在 1 年内均未曾发生甲型 H1N1 流感,同时排除合并其他常见病毒感染(如 HBV、HIV 等)、自身免疫性疾病等。H1N1 病例组与健康对照组在性别、年龄上差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),同时 H1N1 病例组与健康对照组均对本研究知情同意。

1.2 仪器与试剂 血液 DNA 抽提试剂盒(QIAamp Blood Mini Kit,德国 Qiagen 公司),Ex Taq HS DNA 聚

合酶购自日本 TAKARA 公司,TOF-MS 飞行时间质谱仪、纳升点样仪、质谱微阵列芯片购自美国 SEQUENOM 公司,Veriti-384 孔多任务梯度 PCR 仪为美国 ABI 公司产品,其它实验耗材购自 Axygen。

## 1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 收集抗凝外周血 2.0mL,使用全基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,严格按照说明书操作,提取的 DNA 后置于一 $30^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

1.3.2 IL-1 基因 SNP 的选择 从 HamMap 数据库中筛选已有文献报道与其他疾病相关的 IL-1 $\beta$  基因 SNP 位点,包括 rs1143623、rs1143639、rs16944、rs3917345 四个 snp 位点。

1.3.3 引物设计 采用 Sequenom 公司提供的 TOF-MS 多重引物设计软件程序以及 Assay Designer3.1 软件包设计扩增、延伸引物,每个 SNP 位点对应两条 PCR 扩增引物和一条延伸引物(表 1),所有引物均由 invitrogen 公司合成。

表 1 各 SNPs 位点扩增引物及延伸引物序列表

Table 1 Sequence table of amplification primers and extension primers for SNPs

SNPs 位点 loci	正向引物(5'-3')Forward primer	反向引物(5'-3')Reverse primer	延伸引物(5'-3')Extension primer
rs1143623	ACGTTGGATGATGTGCCAG	ACGTTGGATGTTCCCTCG	CTCTTGCTCGCTCTG
rs1143639	ACGTTGGATGAGACCTGTT	ACGTTGGATGCCTCCTGCT	CCTAGGGATGGGGGT
rs16944	ACGTTGGATGTGTCTGTAT	GGCTCCTGCAATTGACA	GCTGTTCTCTGCCTCA
rs3917345	ACGTTGGATGTGCTGCT	GAGACTCTATCTCTTGG	AGAAACTGATAACTCT

1.3.4 SNP 等位基因分型 首先在 384 孔板常规扩增待测片段(PCR 反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30s, 40 cycles,  $72^{\circ}\text{C}$  3min),然后在每个 PCR 产物中加入 2 $\mu\text{L}$  碱性磷酸酶消化液,以除去未用尽 dNTPs,反应条件:  $37^{\circ}\text{C}$  30min,  $85^{\circ}\text{C}$  10 min,然后根据 SEQUENOM 程序进行引物延伸反应,单碱基延伸反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  5min,  $94^{\circ}\text{C}$  5 s, ( $52^{\circ}\text{C}$  5 s,  $80^{\circ}\text{C}$  5 s, 5 cycles), 40 cycles,  $72^{\circ}\text{C}$  3min。在终止反应物中加入 6 mg 阳离子交换树脂脱盐,混合后加入 16  $\mu\text{L}$  蒸馏水悬浮。用纳升点样仪将纯化后的产物分点在质谱微阵列芯片上。在 Typer4.0 操作程序中编辑相对应的引物和样本,并按顺序读取相对应的 SNPs 分型数据。

1.4 统计分析 采用四格表卡方检验比较 H1N1 组与对照组的等位基因频率差异,进一步计算各等位基因与甲型 H1N1 流感发生的比值比(OR)和 95% 可信区间(95%CI);以  $P < 0.05$  作为差异有统计学意义的判断标准。统计分析由 GraphPad Prism4 统计完成。

## 2 结果

2.1 SNP 位点质谱分型结果 rs1143623 位点有 CC、CG、GG3 种基因型;rs1143639 位点有 AG、GG2 种基因

型,rs16944 包括 AA、AG、GG3 种基因型,rs3917345 只有 DEL 这一种基因型。

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 对两组人群中 rs1143623、rs1143629、rs16944 这三个 SNP 位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,基因型分布实际值近似于推算获得的期望值,提示 3 个 SNP 位点处于遗传平衡状态( $P > 0.05$ ),提示用于研究的两组样本来自遗传平衡的群体,具有良好的代表性;rs3917345 位点由于只有一种基因型,不能进行该检验。

2.3 IL-1 基因各 SNPs 等位基因频率与甲型 H1N1 流感的相关性 检测结果显示 rs16944 位点 A 等位基因频率在 H1N1 组和对照组中分别为 61.9% 和 49.5%,差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.761$ ,  $P = 0.001$ ),含 G 等位基因的相对危险度 OR=0.602,95%CI 为 0.444~0.816。

rs1143639 位点 G 等位基因频率在 H1N1 组和对照组中分布为 95.5% 和 98.7%,差异也有统计学意义( $\chi^2 = 6.708$ ,  $P = 0.0096$ ),含 A 等位基因的相对危险度 OR=3.564,95%CI 为 1.281~9.917。rs1143623 位点各等位基因频率之间差异无统计学意义( $\chi^2 = 3.704$ ,  $P > 0.05$ )。采用 Bonferroni 递减调整法对  $P$  值进行概率校正后,rs16944 位点和 rs1143639 位点各等位基因频率

表2 IL-1β基因各SNPs位点等位基因频率与甲型H1N1流感的关系  
Table 2 Relationship between allele frequency of IL-1β gene SNPs

SNP位点 loci		对照组 Control group	H1N1组 H1N1group	χ <sup>2</sup>	P值* Pvalue	校正P值 corrected Pvalue	OR	95%CI
rs16944	等位基因频率	A	190(49.5)	10.761	0.001	0.003	0.602	0.444~0.816
	allele frequency(%)	G	194(50.5)					
	基因型 genotype	AA	44					
		AG	102					
		GG	46					
rs1143639	等位基因频率	G	379(98.7)	6.708	0.0096	0.0192	3.564	1.281~9.917
	allele frequency(%)	A	5(1.3)					
	基因型 genotype	GG	187					
		GA	5					
		AA	0					
rs1143623	等位基因频率	G	207(53.9)	3.704	0.054	0.054	1.334	0.994~1.791
	allele frequency(%)	C	177(46.1)					
	基因型 genotype	GG	56					
		GC	95					
		CC	41					

注：\* H1N1组与对照组等位基因频率比较，#采用Bonferroni递减调整法对P值进行校正  
Note: \* Comparison of allele frequency between H1N1 group and control group; #P value was corrected with Bonferroni Step-Down Adjustment.

在流感组和对照组之间的差异仍有统计学意义( $P=0.003$  , $P=0.0192$ )(表2)。

3 讨论

流感病毒是一种非常古老的病原微生物 ,曾经引起数次世界范围的大流行 ,其中1918~1919年的 西班牙 H1N1流感是历史上最为严重的一次 ,期间传遍欧洲、亚洲和北美洲 ,导致上千万人死亡 ,且多数死者为15~35岁之间的健康年轻人<sup>[12]</sup>。2009年发生的新 型甲型H1N1流感作为一种新发传染病 ,大多数患者 临床表现为轻微上呼吸道疾病 ,少数继发严重肺炎、 急性呼吸窘迫综合征等并发症 ,甚至死亡<sup>[13]</sup> ,但同时 甲型H1N1流感病程具有自限性 ,感染甲型H1N1病 毒后的人体可不发病<sup>[14]</sup>。说明新型甲型H1N1流感病 毒感染与宿主遗传基因可能有所联系 ,本项研究就针 对宿主的遗传基因多态性 ,探讨甲型H1N1病毒感染 宿主的遗传易感性。

通过本次研究发现 rs1143623位点和 rs3917345 位点与H1N1流感易感性无关联 ,rs16944位点甲型 H1N1组A等位基因频率显著高于对照组( $P=0.001$ ) , 提示该位点A为易感基因 ,G为保护性基因 ; rs1143639位点G等位基因频率H1N1组低于对照组 ( $P=0.0096$ ) ,提示G为保护性基因 ,A为易感基因。 rs16944位点A>G和rs1143639位点G>A等位基因多 态性可能会影响IL-1β基因的功能表达 ,进而改变其 生物学功能。这些基因多态性导致的功能差异正是 我们下一步研究的方向 ,进而了解其作用机制或者信

号通路。  
本研究表明 ,rs1143639位点与rs16944位点单核 苷酸多态性与新型甲型H1N1流感易感性相关 ,可以 进一步扩大样本量或者多地区取样来验证该结果。 同时多态性位点相关功能分析研究也值得进一步探 讨。

参考文献：

[1] Zarychanski R ,Stuart T ,Kumar A ,et al. Correlates of severe disease in patients with 2009 Pandemic influenza(H1N1)virus infection [J]. Can- adian Medical Association ,2010 ,182(3) :257-264.  
[2] Garten RJ ,Davis CT ,Russell CA ,et al. Antigenic and genetic charac- teristics of swine-origin 2009 A(H1N1)influenza viruses circulating in humans [J]. Science ,2009 ,325(5937) :197-201.  
[3] Greenbaum JA ,Kotturi MF ,Kim Y ,et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human pop- ulation[J]. PNAS ,2009 ,106(48) :20365-20370.  
[4] Jung T ,Choi C ,Chae C. Localization of swine influenza virus in natural- ly infected pigs [J]. Vet Pathol ,2002 ,39(1) :101.  
[5] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease [J]. Blood , 1996 ,87(6) :2095-2147.  
[6] Xu P ,Li Y. Research progress on Interleukin-1 gene polymorphisms [J].Foreign Medical Sciences (section of Clinical Biochemistry and Lab- oratory Medicine),2003,24(6):347-348. (In Chinese)  
(徐朴 李艳. 白细胞介素-1基因多态性的研究进展[J]. 国外医学临 床生物化学与检验学分册 ,2003 ,24(6) :347-348.)  
[7] Cigrovski Berkovic M ,Catela Ivkovic T ,Marout J ,et al. Interleukin 1β gene single-nucleotide polymorphisms and susceptibility to pancreatic neuroendocrine tumors [J]. DNA Cell Biol ,2012 ,31(4) :531-536.  
[8] Zhu YH, Xu YC ,Zhou B ,et al. Association of Interleukin-1B gene (下转第1061页)



- [3] Geneva, Switzerland. World Malaria Report 2009[J]. World Health Organization; 2009. 27-44.
- [4] Kathleen F. Bush, George Luber, S. Rani Kotha, et al. Impacts of Climate Change on Public Health in India: Future Research Directions[J]. Environmental Health Perspectives. 2011, 6:119.
- [5] Ahmet Özbilgin, Seher Topluoglu, Saffet Es, et al. Malaria in Turkey: Successful control and strategies for achieving elimination[J]. Acta Tropica. 2011, 120:15-23.
- [6] Alberto Gomez-Eliphe, Angel Otero, Michel van Herp, et al. Forecasting malaria incidence based on monthly case reports and environmental factors in Karuzi, Burundi, 1997-2003[J]. Malaria J. 2007, 6:129.
- [7] Gan YB, Liao Z, Cai J, et al. Seasonal distribution of the measles by concentration degree and circular distribution[J]. Modern Prev Med, 2009, 36(12): 2229-2237. (In Chinese)  
(甘仰本, 廖征, 蔡军, 等. 集中度和圆形分布法分析南昌市 1985~2007 年麻疹季节性分布[J]. 现代预防医学, 2009, 36(12): 2229, 2237.)
- [8] Zhang J, Zhang SY, Gao QJ. Analysis of seasonality and long-term trend of bacillary dysentery with circle distribution in Shijiazhuang City[J]. Chin J Dis Control Prev, 2011, 15(1): 75-76. (In Chinese)  
(张娟, 张世勇, 高秋菊. 圆形分布法分析石家庄市细菌性痢疾发病的季节性和长期趋势[J]. 中华疾病控制杂志, 2011, 15(1): 75-76.)
- [9] Yu JX, Lou PA, Chen PP, et al. Analysis on seasonality of diarrhea syndrome in Xuzhou city by using circle distribution[J]. Chinese Journal of General Practice, 2010, 8(11): 1351-1352. (In Chinese)  
(余加席, 娄培安, 陈培培, 等. 用圆形分布法探讨徐州市腹泻症候群发生的时间规律[J]. 中华全科医学, 2010, 8(11): 1351-1352.)
- [10] Huang HQ, Hu J, Zhang J. Epidemiological survey of malaria in Xinyang city in 2005-2010[J]. China tropical medicine, 2012, 12(2): 139-143. (In Chinese)  
(黄河秋, 胡骏, 张继. 信阳市 2005-2010 年疟疾流行病学分析[J]. 中国热带医学, 2012, 12(2): 139-143.)
- [11] Wang WM, Zhou HY, Cao J. Analysis of seasonal variations of plasmodium vivax malaria in Jiangsu Province with round distribution[J]. China tropical medicine, 2011, 11(6): 664-666. (In Chinese)  
(王伟明, 周华云, 曹俊. 圆形分布法分析江苏省间日疟发病季节变化[J]. 中国热带医学, 2011, 11(6): 664-666.)
- [12] Zhuoma YJ, Wu XL, Wang HJ, et al. Analysis of malaria epidemic in Motuo county, Tibet in 1981-2010[J]. China tropical medicine, 2012, 12(3): 265-267. (In Chinese)  
(卓玛央金, 吴晓丽, 王洪举, 等. 西藏墨脱县 1981-2010 年疟疾流行特征分析[J]. 中国热带医学, 2012, 12(3): 265-267.)
- [13] Kinley Wangdi, Pratap Singhasivanon, Tassanee Silawan, et al. Development of temporal modelling for forecasting and prediction of malaria infections using time-series and ARIMAX analyses: A case study in endemic districts of Bhutan[J]. Malaria Journal. 2010, 9:251.
- [14] Karina Laneri, Anindya Bhadra, Edward L. Ionides, et al. Forcing Versus Feedback: Epidemic Malaria and Monsoon Rains in Northwest India [J]. PLoS Computational Biology. 2010, 6:9.
- [15] Sheng HF, Tang LH. Surveillance and forecasting of malaria epidemics [J]. Int J Med Parasit Dis, 2007, 34(3): 163-168. (In Chinese)  
(盛慧锋, 汤林华. 疟疾暴流行的监测和预测[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2007, 34(3): 163-168.)
- [16] Peng Bi, Tong S, Donald K, et al. Climatic variables and transmission of malaria: A 12-year data analysis in Shuchen County, China[J]. Public Health Reports. 2003, 118:65-71.
- [17] Dye C, Reiter P. Temperatures without fevers[J]. Science. 2000, 289: 1697-1698.

收稿日期 2012-05-18 编辑 符式刚

(上接第 1057 页)

- polymorphisms with coronary heart disease [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Ed) 2009, 40(1): 73-76. (In Chinese)  
(朱银华, 徐永春, 周斌, 等. 白细胞介素-1B 基因启动子-31T/C 和外显子 5+3953C/T 多态性与冠心病的相关性研究[J]. 四川大学学报医学版, 2009, 40(1): 73-76.)
- [9] Zhang GZ, Feng WF, Huang LJ, et al. Association between Interleukin-1B gene polymorphisms and Intracranial aneurysm [J]. Guangdong Medicine 2008, 29(12): 2016-2018. (In Chinese)  
(张国忠, 冯文峰, 黄理金, 等. 白细胞介素-1β 基因多态性与颅内动脉瘤的关系[J]. 广东医学, 2008, 29(12): 2016-2018.)
- [10] Li H, Pan SY, Hu WJ. Relationship of interleukin-1β, tumor necrosis factors-β and interleukin-10 gene polymorphisms with serum lipoprotein level in Chinese Han population in Guangdong Province [J]. J South Med Univ 2008, 28(9): 1679-1683. (In Chinese)  
(李卉, 潘速跃, 胡文娟. 广东地区汉族人群 IL-1β、TNF-β 及 IL-10 基因多态性与血脂的关系[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(9): 1679-1683.)
- [11] Li QS, Zhang L, Mei Q, et al. Relationship between -511 site polymorphism of IL-1B gene and ILRN gene polymorphisms and peptic ulcer [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2009, 44(6): 735-738. (In Chinese)  
(李球森, 张磊, 梅俏, 等. 白细胞介素-1B-511 和白细胞介素-1RN 基因多态性与消化性溃疡的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(6): 735-738.)
- [12] Morens DM, Fauci AS. The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century[J]. J Infect Dis 2007, 195: 1018-1028.
- [13] Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamoni D, Ponce de Leon S, et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico [J]. N Engl J Med 2009, 361(7): 680-689.
- [14] Liu H. Research progress on A/H1N1 influenza [J]. Medicine of Harbin, 2011, 31(4): 295-296. (In Chinese)  
(刘红. 甲型 H1N1 流感的研究进展[J]. 哈尔滨医药, 2011, 31(4): 295-296.)

收稿日期 2012-05-16 编辑 谢永慧