

IL-12B+1188A/C 基因多态性与宁夏汉族煤工 尘肺易感性研究

党占翠¹, 宋琦如¹, 李吴萍¹, 杨文海², 吴向林²

摘要: [目的] 探讨白介素-12B(interleukin-12B, *IL-12B*) 基因 3'UTR 区 1188A/C 位点多态性与宁夏汉族煤工尘肺(coal worker's pneumoconiosis, CWP)易感性的关系。[方法] 采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性(PCR-RFLP)法对 120 例 CWP 患者和 120 例煤尘接触组 *IL-12B* 基因 1188A/C 位点多态性进行分型, 对等位基因及基因型分布进行统计学分析。[结果] 煤工尘肺组与煤尘接触组在接尘工龄、工种构成、吸烟烟龄差异无统计学意义($P>0.05$)。对年龄进行标化后, 分析发现 *IL-12B* 1188A/C 位点在煤工尘肺组和煤尘接触组中检出三种基因型 AA、AC、CC 型, 这三种基因型在尘肺组和接触组间分布差异无统计学意义($P>0.05$); 等位基因 C 在煤工尘肺组和煤尘接触组中所占比例分别为 45.8% 和 36.7%, 差异有统计学意义($P<0.05$), 在接尘工龄、工种和是否吸烟中的分布无差异($P>0.05$)。[结论] *IL-12B* 1188A/C 位点 C 等位基因可能是宁夏汉族煤工尘肺的易感基因之一。

关键词: 煤工尘肺; 白介素-12B; 聚合酶链反应-限制片段长度多态性; 多态性

Gene Polymorphisms of Interleukin-12B+1188A/C and Susceptibility of Coal Worker's Pneumoconiosis in Han Ethnic Group in Ningxia Area DANG Zhan-cui¹, SONG Qi-ru¹, LI Wu-ping¹, YANG Wen-hai², WU Xiang-lin² (1.School of Public Health, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2.Ningxia Hui Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750006, China). Address correspondence to SONG Qi-ru, E-mail: Sqr20@163.com

Abstract: [Objective] To investigate gene polymorphisms of Interleukin-12B (*IL-12B*+1188A/C) and susceptibility of coal worker's pneumoconiosis (CWP) in Han ethnic group workers. [Methods] SNP 1188A/C of *IL-12B* gene was detected by polymerase chain reaction (PCR) based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique in 120 CWP patients and 120 coal dust exposure workers. [Results] The length of exposure to dust, job title, age of smoking frequencies were not significantly different between the cases and the controls ($P>0.05$). Three genotypes (AA, AC, CC) were detected in *IL-12B* (1188A/C) and no significant difference was found between the CWP group and the controls ($P>0.05$) after age standardization. The proportion of C allele showed statistical difference between the cases (45.8%) and the controls (36.7%). Significant difference between the CWP patients and the controls was found in frequencies of C alleles ($P<0.05$). The distributions in the dust exposure duration, job title and smoking were no significant differences ($P>0.05$). [Conclusion] The study found that *IL-12B*+1188A/C sites C allele may be one of the susceptible gene in CWP of Han ethnic group in Ningxia area.

Key Words: coal worker's pneumoconiosis; Interleukin-12B; PCR-restriction fragment length polymorphism; Polymorphism

尘肺是我国法定职业病中对工人健康危害非常严重的一类疾病, 据统计目前我国大陆尘肺病例约占职业病患者总人数的近三分之二。在所有的尘肺病中, 煤工尘肺发生的比例最高, 其中美国达 70% 以上, 英国达 75% 以上, 我国大陆也达到 50% 以上^[1]。煤工尘肺一旦发生, 即使脱离接触粉尘, 仍可缓慢发展, 故至今仍然是世界上最重要的职业卫生问题之一^[2]。

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目资助(编号: NZ0996)

[作者简介] 党占翠(1980—), 女, 硕士生, 研究方向: 职业与健康评价;

E-mail: dangzhancui1980@126.com

[通讯作者] 宋琦如教授, E-mail: Sqr20@163.com

[作者单位] 1. 宁夏医科大学公共卫生学院, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏回族自治区疾病预防控制中心, 宁夏 银川 750006

尘肺发病机制十分复杂, 近年来, 对于尘肺发生的细胞学及分子机制的研究有了较大进展, 国内外研究者认为多种细胞因子在肺纤维化的形成过程中发挥着重要作用, 其中白介素的作用尤其受到重视。最近的报道显示在 *IL-12* p40 亚单位的 3'UTR 区域 1188 位置处有 A→C 的改变^[3], 并且发现 A/A 基因型与 I 型糖尿病^[4]和多发性硬化病^[5]有关。基于上述研究结果, 本项目拟主要研究 *IL-12B* 基因多态性与宁夏地区煤工尘肺的易感性关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象的选择和资料的收集

1.1.1 对象的选择 以宁夏某煤业集团所属煤矿已确诊的 120

例尘肺病例为病例组,选择与病例同性别、同工种、同民族,相同的开始接尘年代及累积接尘工龄(±2年)的接尘工人 120 例作为煤尘接触组;所有研究对象均为有确切煤尘接触史、职业史和作业环境相似的人群,均为男性汉族,彼此无血缘关系,无免疫系统疾病和其他重大疾病。对所有研究对象拍摄 X 线后前位胸片,由专家组按《国家尘肺诊断标准》(GBZ70—2002)^[6]进行统一诊断确定。

1.1.2 资料收集 设计调查表,对每位研究对象进行问卷调查,内容包括姓名、性别、年龄、民族等一般资料及吸烟史、饮酒史、既往病史。通过“接尘工人管理登记卡”记录病例和对照的职业史、尘肺诊断情况等资料。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及基因组 DNA 的提取 对每个研究对象采集外周静脉血 3~5 mL,置于含乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的真空无菌管中混匀,及时置于-20℃冰箱中保存(并在一周内完成 DNA 的提取),用常规酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.2.2 基因多态性分析 (1)PCR:上游引物 5-GTTACAATGTCACCCACACA-3,下游引物 5-CACCATCTCCAGGAAGTCT-3',引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。扩增条件为 94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,56.9℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共 35 个循环。最后 72℃延伸 7 min,4℃保存。扩增产物长度为 644 bp。(2)酶切及电泳分析:用限制性核酸内切酶 Taq I 识别限制性位

点。酶切的反应体系包括 10 μL PCR 反应产物与 10 U 限制性内切酶 Taq I 在 65℃条件下消化 5 h。酶切产物经质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,用凝胶成像系统观察并记录实验结果。包含 C 等位基因的片段可以被限制性内切酶 Taq I 切为 201 bp 和 443 bp,包含 A 等位基因的片段不能被切,片段大小为 644 bp。③测序:对判断结果为 *IL-12B*+*1188AA* 纯合子、*AC* 杂合子、*CC* 纯合子基因型的标本进行测序验证。

1.3 质量控制

采用统一的调查表,调查员经过统一培训,仔细核查每一份调查表,将不符合要求和漏填项较多者剔除。

1.4 统计分析

所有计量数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间各指标比较采用 *t* 检验,多组间各指标比较采用方差分析;两组间等位基因计数资料比较用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 煤工尘肺病例组与煤尘接触组的一般情况

接尘工龄、工种分布比例、吸烟烟龄在煤工尘肺组和煤尘接触组之间差异均无统计学意义($P>0.05$);煤工尘肺组和煤尘接触组之间年龄差异有统计学意义($P<0.05$),需对其进行标化,表 1。

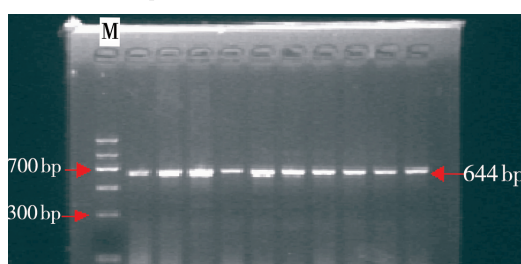
表 1 煤工尘肺病例组与煤尘接触组的人群基本情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The basic information of the CWP group and the coal dust exposure group

组别 Group	例数 <i>n</i>	年龄 Age	吸烟烟龄 Age of smoking	接尘工龄 Length of exposure	工种 Job title	
					主掘进工(%) Driller	主采煤工(%) Miner
煤工尘肺组(Coal worker's pneumoconiosis)	120	54.9 ± 16.0	9.9 ± 11.9	17.2 ± 7.7	63(52.5)	57(47.5)
煤尘接触组(Coal dust exposure group)	120	43.8 ± 4.3	12.7 ± 10.9	17.1 ± 5.9	56(52.2)	64(52.9)
<i>t</i>	—	7.383	1.896	0.08	—	
χ^2	—	—	—	—	0.817	
<i>P</i>	—	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

2.2 *IL-12B* 基因的 3'UTR 区单核苷酸位点 1188A/C 基因型电泳结果

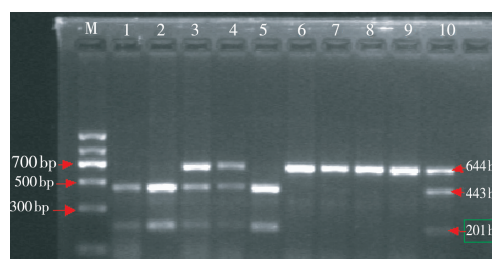
采用 PCR-RFLP 法分析该位点在人群中的基因型,1188A/C 位点 PCR 扩增产物为 644 bp,结果见图 1,经 Taq I 消化后可区分出 3 种基因型:AA 基因型不被 Taq I 消化,终产物为 644 bp;AC 基因型能消化后产生 644、201、443 bp 3 条带;CC 基因型则为 201、443 bp 2 条带,结果见图 2。



[注] M 为 DNA Marker(M: DNA Marker)

图 1 *IL-12B*(1188A/C) PCR 电泳结果

Figure 1 The PCR result of *IL-12B* 1188 Position



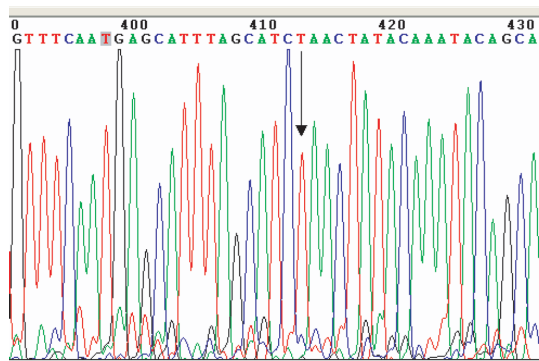
[注] M 为 DNA Marker; Lane 1、2、5 为 CC 型; Lane 3、4、10 为 AC 型; Lane 6、7、8、9 为 AA 型(M: DNA Marker; 1、2、5: CC genotype; Lane 3、4、10: AC genotype; Lane 6、7、8、9: AA genotype)。

图 2 *IL-12B*(1188A/C) 酶切结果

Figure 2 The result of *IL-12B* 1188 Position Enzyme digestion

2.3 酶切产物经反向测序的测序图谱三种基因型展示

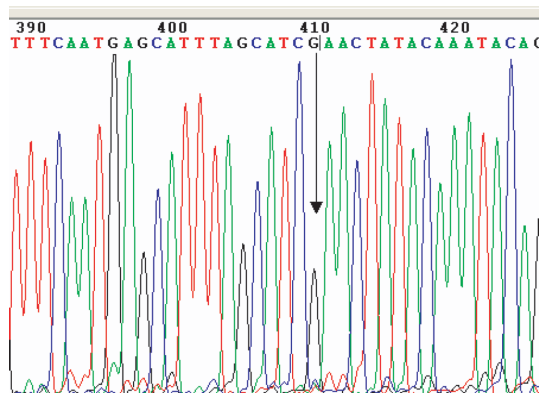
经测序验证进一步证实酶切结果的可靠性,确定 *IL-12B* 基因 3'UTR 区+1188 位点存在 A/C 多态性,突变后存在 AA 纯合子、AC 杂合子、CC 纯合子三种基因型。结果见图 3~5。



[注] 箭头所指为 +1188A(或 T) 碱基 [The arrows indicate +1188 A(or T) base]。

图 3 IL-12B(1188A/C) 基因型 AA(或 TT) 的测序结果

Figure 3 The sequence image of IL-12B(1188)Position(genotype: AA or TT)



[注] 箭头所指为 +1188C(或 G) 碱基 [The arrows indicate +1188 C(or G) base]。

图 4 IL-12B(1188A/C) 基因型 CC(或 GG) 的测序结果

Figure 4 The sequence image of IL-12B(1188)Position(genotype: CC or GG)

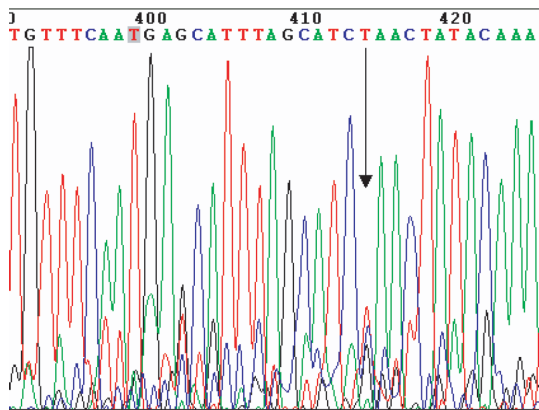


图 5 IL-12B(1188A/C) 经酶切后基因型 AC(或 TG) 的测序结果

Figure 5 The sequence image of IL-12B(1188)Position(genotype: AC or TG)

2.3 遗传平衡定律检验

经遗传平衡定律检验, IL-12B+1188 位点基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡法则, 表明基因型频率已达遗传平衡, 所选择群体具有群体代表性。

2.4 组间基因型及等位基因分布频率分析结果

基因型在煤工尘肺组和煤尘接触组比较, $\chi^2=3.606$, $P=0.165>0.05$, 差异无统计学意义。等位基因 C 在煤工尘肺组和煤尘接触组比较 $\chi^2=4.161$, $P=0.041<0.05$, 差异有统计学意义。煤工尘肺组与煤尘接触组等位基因比值比: $OR(C)=1.462$ (95%CI, 1.014~2.106), 见表 2。等位基因 C 在煤尘接触工龄、工种、吸烟中频数分布比较, 结果显示煤工尘肺组与煤尘接触组差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 2 IL-12B+1188 位点的基因型在煤工尘肺病例组和煤尘接触组中的分布

Table 2 The distribution of IL-12B+1188 genotype and allele frequency in the CWP group and the coal dust exposure group					
组别 Group	例数 n	基因型(%) Genotype			等位基因分布频数(%) Allele frequency
		AA	AC	CC	A C
煤工尘肺组 CWP	120	40(33.3)	50(41.7)	30(25.0)	130(54.2) 110(45.8)
煤尘接触组 Coal dust exposure	120	52(43.3)	48(40.0)	20(16.7)	152(63.3) 88(36.7)
χ^2	—	3.606			4.161
P	—	0.165			0.041

表 3 C 等位基因在煤尘接触工龄、吸烟、工种中频数分布

Table 3 The distribution of allele C frequency in length of exposure, smoking and job title				
项目 Item	煤工尘肺组 CWP	煤尘接触组 Coal dust exposure	χ^2	P
接尘工龄(年) Length group of exposure			3.479	0.176
<10	22	9		
10~	38	35		
20~	51	44		
吸烟 Smoking			3.446	0.063
不吸烟	51	29		
吸烟(含戒烟)	60	59		
工种 Job title			2.150	0.143
主采煤工 Coal workers	54	52		
主掘进工 Main excavation	57	36		

3 讨论

尘肺的发生是环境与遗传因素共同作用的结果。粉尘暴露是尘肺发生的必要条件, 但在同样粉尘暴露情况下, 尘肺的发病及其严重程度存在着很大差异。以上情况提示虽然接尘是尘肺的启动因素, 但尘肺的发生与某些遗传机制及个体易感性可能存在关联。

在众多的可溶性介质中, 白细胞介素 12(Interleukine-12,

IL-12)的作用尤其重要。它具有多种重要生物学活性,参与机体免疫调节的许多方面,是连接先天性免疫和获得性免疫的功能性桥梁,具有重要的抗感染、抗肿瘤作用^[7]。IL-12是一个相对分子量为70 000的异源二聚体细胞因子,由相对分子量为40 000(p40)和35 000(p35)两条肽链组成,编码这两条链的基因(*IL-12B*与*IL-12A*)位于不同染色体上。*IL-12B*位于染色体5q31-q33,编码p40,全长16 kb,在遗传学中研究发现此位置与免疫应答有关^[8]。SAKAMOTO等^[9]发现IL-12可能通过加速树突状细胞活性和上调1型辅助性T细胞(TH1)和自然杀伤细胞(NK)活性,而抑制晚期肺纤维化发展。在不同矽尘颗粒诱导大鼠肺炎症和纤维化研究中却发现,矽尘颗粒刺激反应诱导肺组织中IL-12p40过量表达,导致肺纤维化的蔓延,而异二聚体IL-12p70的表达则下降,认为IL-12p40通过加剧巨噬细胞募集,参与矽尘诱导的鼠肺炎症和纤维化的发生发展过程^[10]。袁宝军等^[11]研究发现IL-12参与CWP发展过程,与CWP发生和发展均有密切关系。基于以上研究,本研究从分子水平即基因位点多态性上阐明CWP的发生机理,选择了*IL-12B*与疾病的发生、发展的相关性所必然选择的位点之一+1188(A/C)位点,研究其基因多态性与CWP发生、发展的关系。

STANILOVA等^[12]研究显示血清IL-12p40水平的提高与尘肺的严重性有关,提示IL-12p40纤维化作用是与尘肺严重程度有关。目前,国内对*IL-12B*基因多态性与尘肺的发病是否存在关联,尚未见报道。本研究发现,*IL-12B*基因+1188位点CC基因型在煤工尘肺组所占比例(25.0%)明显高于煤尘接触组(16.7%),而AA基因型在煤工尘肺组所占比例(33.3%)低于煤尘接触组(43.3%),比较两组间三种基因型的分布频率却发现差异不具有统计学意义($P=0.165$)。C等位基因在尘肺组所占比例(45.8%)明显高于煤尘接触组(36.7%), $OR=1.462$ (95%CI, 1.014~2.106),比较两组C等位基因的分布频率发现差异有统计学意义($P=0.041$),提示C等位基因可能是宁夏汉族煤工尘肺的易感基因之一,而C等位基因在接尘工龄、是否吸烟、不同工种间的分布频率差异均无统计学意义。这与STANILOVA等的研究结论不一致,这可能与其研究中采用的对照人群(50%男性,50%女性)中114例为正常人群对照,24例为接尘对照,并且未对吸烟等影响因素进行严格控制等有关。此外,由于此次研究在获取个人准确的累积接尘量中存在很大困难,仅用暴露工龄长短作为接触史。因此,尚需进一步深入研究以论证本次研究的结论。

参考文献:

- [1] 徐英峰,冯海明.对润滑剂润湿煤尘影响因素的研究[J].中国煤炭,2005,31(1):39-40.
- [2] LEDOTOV L. ILO/WHO全球消除矽肺的国际规划[J].工业卫生与职业病,1998,24(1):16-17.
- [3] HALL MA, MCGLINN E, COAKLEY G, et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease[J]. Genes Immun, 2000, 1(2): 219-224.
- [4] MORAHAN G, HUANG D, YMER SI, et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele[J]. Nat Genet, 2001, 27(20): 218-221.
- [5] Van VEEN T, CRUSIUS JB, SCHRIJVER HM, et al. Interleukin-12 p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis[J]. Ann Neurol, 2001, 50(10): 275-275.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GBZ 70—2002 国家职业卫生标准 尘肺诊断标准[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [7] 杨家和,钱其军,吴孟超,等.白介素12:重要的免疫调节因子[J].世界华人消化杂志,1999,7(1):71-72.
- [8] WALLEY AJ, WILTSHIRE S, ELLIS CM, et al. Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits[J]. Genomics, 2001, 72(1): 15-20.
- [9] SAKAMOTO H, ZHAO LH, JAIN F, et al. IL-12p40^{-/-}Mice treated with intratracheal bleomycin exhibit decreased pulmonary inflammation and increased fibrosis[J]. Exp Mol Pathol, 2002, 72(1): 1-9.
- [10] HUAUX F, ARRAS M, TOMASI D, et al. A profibrotic function of IL-12p40 in experimental pulmonary fibrosis[J]. J Immunol, 2002, 169(5): 2553-2661.
- [11] 袁宝军,刘志忠,丁秀荣,等.煤工尘肺患者血清白细胞介素-12和 γ -干扰素含量的变化[J].工业卫生与职业病,2006,32(6):348-350.
- [12] STANILOVA S, MITEVA L, PRAKOVA G. Interleukin-12B-3' UTR polymorphism in association with IL-12p40 and IL-12p70 serum levels and silicosis severity[J]. Int J Immunogenet, 2007, 34(3): 193-199.

(收稿日期:2010-12-09)

(英文编审:金克峙;编辑:洪琪;校对:徐新春)