

IL-23R 基因多态性与桥本甲状腺炎关联性研究

李志华¹ 王宇飞² 韩捷² 张惠¹ 李春霞¹ 马群¹

(¹ 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 济宁 272011)

摘要 目的 在中国山东籍汉族桥本甲状腺炎(hashimoto thyroiditis, HT)患者中,探讨白细胞介素受体(interleukin-23 receptor, IL-23R)基因多态性与 HT 的相关性,及其致病的分子生物学机制。**方法** 在 145 例 HT 患者和 150 名正常对照中,用限制性片段长度多态性分析的方法,对 IL-23R 基因的 2 个单核苷酸(rs17375018, rs7517847)多态性进行基因分型,分析单个位点的等位基因和基因型频率是否与 HT 相关。**结果** 在 HT 患者中,rs17375018 G 的等位基因频率($P=0.013$)和基因型频率($P=0.034$)均超过正常对照组,差异有统计学意义;rs7517847 的等位基因频率及基因型频率与正常对照组无显著性差异。**结论** rs17375018 基因多态性与 HT 存在显著的相关性,rs17375018 基因可能增加 HT 的易感性。

关键词 桥本甲状腺炎;白介素;基因型;多态性

中图分类号: R581.4 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2014)08-256-04

Association between polymorphism of IL-23R and hashimoto thyroiditis

LI Zhi-hua, WANG Yu-fei, HAN Jie, et al

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the association between interleukin-23 receptor(IL-23R) gene polymorphism and hashimoto thyroiditis(HT) in Han population from Shandong province in china. **Methods** An correlation analysis was performed in a case-control cohort of 145 HT cases and 150 controls, and two SNPs located in the promoters of IL-23R gene (rs17375018, rs7517847) were examined by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Statistics Product and Service Solutions(SPSS) software programs were used to calculate genotype and alleles frequencies and study the relationship between frequencies of genotype and alleles of the two sites and HT. **Results** The frequencies of allele G at positions 17375018 significantly increased in HT cases compared with control, so were their genotype frequencies. No association was found in HT and control in rs7517847. **Conclusion** Our study demonstrated that the HT is highly associated with polymorphism of rs17375018 in Chinese Han population. rs17375018 gene may play a role in HT susceptibility.

Key words: Hashimoto thyroiditis; Interleukin-23 receptor; Genotype; Polymorphism

桥本甲状腺炎(hashimoto thyroiditis, HT)又称自身免疫性甲状腺炎,是一种以自身甲状腺组织为抗原的慢性自身免疫性疾病,是临床中最常见的甲状腺炎症。已知众多的免疫应答和炎症介质均与 HT 有关,包括一些与自身免疫病和炎症调节有关的分子基因,如白细胞介素 23 受体(interleukin-23 receptor, IL-23R)基因。IL-23R 基因定位于人类 1 号染色体 1p31.3 上,其开放的读码框由 12 个外显子组成,长度约为 92 kb。IL-23R 常见的单核苷酸多态性位点位于 IL-23R 启动子、外显子、内含子或基因内区域,其分子高表达于 T 淋巴细胞、自

然杀伤细胞、树突状细胞等细胞膜上^[1-2], IL-23R 发挥作用须与其配体 IL-23 结合,因此 IL-23R 和 IL-23 是免疫调节途径中的关键分子。已有大量研究证实,IL-23R 基因的单核苷酸多态性(SNP)与多种自身免疫性疾病呈强相关性,如 Crohn's 病^[3]、类风湿性关节炎^[4]、强直性脊柱炎(AS)^[5]及 Behcet's 病等,据此我们猜测 IL-23R 与 HT 之间可能也存在一定的关联性。故本文选取 IL-23R 的 2 个 SNP rs17375018 和 rs7517847,通过病例对照研究,探讨 IL-23R 在 HT 发病中的潜在作用。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选自 2010 年 2 月至 2012 年 10 月收入济宁医学院附属济宁市第一人民医院普外科 HT 患者共 145 例,并排除肝炎、结核病、糖尿病等其它疾病家族史。其中男性 39 例,女性 106 例,平均年龄(37.8±10.4)岁;对照组选自健康体检自愿献血者 150 例,其中男性 38 例,女性 112 例,平均年龄(40.3±11.3)岁。两组对象的性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性(见表 1)。

表 1 病例组与对照组的基本统计学情况

组别	性别	年龄($\bar{x}\pm s$)
HT 组	26.9%(男)	38.1±10.4
对照组	25.3%(男)	40.3±11.3
χ^2/t	0.093	1.741
P	0.76	0.083

1.2 方法

1.2.1 提取 DNA 收集 EDTA 抗凝血 5ml,分离单个核细胞,经蛋白酶 K 消化后,提取纯化 DNA 待用。

1.2.2 SNP 的检测 根据 Jiang Z 等^[6]报道设计引物序列,委托上海英俊生物公司合成(表 2)。

表 2 SNP 引物和限制性内切酶

SNP 位点	引物	限制性内切酶
rs17375018	5'-TTTTTCCCATCTTCTTCTTAA-3'	BSURI
	5'-CGCCCAGCCCTCTTCTCTAATT-3'	
	5'-CCTTTCACCTATTCCCAAGGCC-3'	
rs7517847	5'-GGGCCTAGGAGACAGCCATAA-3'	ECO147I

1.2.3 PCR 反应体系 5μl 反应体系。其中 Taq 酶 2.5μl,基因引物各 20 pmol,模板 DNA200ng,

无菌双蒸水补足反应体系。扩增条件为:95℃ 5min,94℃ 30s,55℃ 30s(rs17375018)/58℃ 30s(rs7517847),72℃ 1min,35 个循环;72℃ 5min。2 个 SNPs 用限制性片段长度多态性 PCR 分析,其 PCR 产物分别用限制性内切酶在 10μl 的反应体系中过夜消化,取 8μl 消化后产物,3.5% 琼脂糖凝胶电泳后染色直接观察结果。为确保结果的准确性,对部分 PCR 产物进行了基因测序。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,显著性水准为 $P<0.05$;基因型分布做 Hardy-Weinberg(HWE)遗传平衡检验。同时计算各等位基因、基因型比值比(odds ratio,OR),及双侧 95% 可信区间(95% CI)。

2 结果

2.1 rs17375018 和 rs7517847 位点 HWE 遗传平衡

HT 组和对照组进行 HWE 遗传平衡检验,其结果显示:样本的期望值与观察值之间的吻合度良好,具有群体代表性(见表 3)。

2.2 rs17375018 和 rs7517847 位点等位基因、基因型频率分析

所有标本均进行 SNP 分型且均获得准确的分型结果。HT 组和对照组的 rs17375018 和 rs7517847 的基因型频率和等位基因频率见表 4。经 χ^2 检验结果可知 rs17375018G 的等位基因和基因型频率均超过对照组($P=0.013,P=0.034$),提示 rs17375018G 与 HT 存在一定关联性;rs7517847 的等位基因与基因型频率在 HT 组与对照组间并无显著性差异(见表 4)。

表 3 rs17375018 和 rs7517847 位点 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果

SNP 位点	基因型	HT 组			对照组		
		观察值	理论值	P	观察值	理论值	P
rs17375018	AA	6	7.51	0.476	16	15.36	0.810
	GA	54	50.97		64	65.28	
	GG	85	86.51		70	69.36	
rs7517847	TT	51	51.60	0.836	53	54.60	0.585
	GT	71	69.79		75	71.79	
	GG	23	23.60		22	23.60	

表4 rs17375018 和 rs7517847 基因型与等位基因分布及其遗传模型分析比较

组别	n	rs17375018					rs7517847				
		基因型(%)			等位基因(%)		基因型(%)			等位基因(%)	
		AA	GA	GG	A	G	TT	GT	GG	T	G
HT 组	145	6(4.2)	54(37.2)	85(58.6)	66(22.8)	224(77.2)	51(35.2)	71(49.0)	23(15.8)	173(59.7)	117(40.3)
对照组	150	16(10.7)	64(42.7)	70(46.6)	96(32.0)	204(68.0)	53(35.3)	75(50.0)	22(14.7)	181(60.3)	119(39.7)
χ^2			6.762			6.322		0.086			0.028
P			0.034			0.013		0.958			0.867
OR			—			0.626		—			1.029
95%CI			—			0.434~0.903		—			0.740~1.430

3 讨论

HT 是一种常见的自身免疫性炎症疾病,患者的血清中常可检测出甲状腺球蛋白抗体、甲状腺过氧化物酶抗体等自身性抗体,病理学变化主要表现为甲状腺滤泡上皮细胞的萎缩、破坏。已有研究证实^[7],这种炎症性的损害与细胞 Th17 分泌的细胞因子 IL-17 具有一定的相关性,而 IL-17 的产生则受到多种细胞因子的调控,如 IL-6、IL-23 等^[8]。已知 IL-23 是免疫反应中的一种正向调控因子,它可以通过促进 IL-17、IL-6、IL-8 和 TNF- α 等前炎症因子的释放来增强炎症反应,同时可调节 Th17 细胞的分化平衡^[9]。因此 IL-23 途径极有可能参与了 HT 的发病机制。

目前,对 IL-23R 与 HT 之间的研究较少。本文发现 IL-23R rs17375018 等位基因 G 频率在 HT 组要高于正常对照组($P=0.013$),GG 基因型可能是 HT 的易感基因($P=0.034$),致病机制可能与其影响靶基因的转录有关。

已知 IL-23R 是 I 型跨膜蛋白,其胞外区与 IL-23 结合后,可导致胞内区下游分子 Jak2、Tyk2 的活化,继而使两个单体转录因子 Stats 二聚体化,并发生磷酸化激活,接着磷酸化的 Stats 二聚体进入细胞核,激活靶基因的转录。而 IL-23R 基因中的单核苷酸多态性会引起转录 mRNA 剪接的改变及所编码氨基酸序列的改变,从而影响基因表达和蛋白质功能。rs17375018 位于基因内区段,其转录产物可以影响其受体的表达^[10]。据此我们推测,在 HT 的发病机制中,rs17375018 G 基因比 A 基因能更有效地激活其下游分子,使其激活靶基因,产生更多的 IL-23R 分子,而 IL-23R 可

以促进 Th1 细胞向 Th17 细胞亚群分化^[11],增加 IL-17、TNF- α 等炎症因子的释放,从而参与 HT 的慢性炎症过程。

近来一些研究证实,rs7517847 的基因多态性与炎性肠病^[12]、过敏性鼻炎^[13]、AS^[14] 等自身免疫性疾病相关,但本实验结果显示,rs7517847 的基因多态性在 HT 组与对照组间并无明显的区别,分析可能与人群的种族、地域及标本的采集量存在差异有关。

本文初步探讨了 IL-23R 的 2 个 SNP 位点的基因多态性与 HT 发病机制的关系,发现 rs17375018 G 基因可能增强 HT 发病的易感性,期望通过我们的研究,能够为 HT 的有效治疗提供一个新的靶位点。

参考文献:

- [1] Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit IL-23R[J]. Immunol, 2002, 168(1):5699-5708.
- [2] Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses[J]. Immunity, 2003, 19(5):641-644.
- [3] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene[J]. Science, 2006, 314(5804):1461-1463.
- [4] Hollis-Moffatt JE, Merriman ME, Rodger RA, et al. Evidence for association of an interleukin 23 receptor variant independent of the R381Q variant with rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(8):1340-1344.
- [5] Dong H, Li Q, Zhang Y, et al. IL23R gene confers susceptibility to ankylosing spondylitis concomitant with uveitis in a Han Chinese population[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e67505.
- [6] Jiang Z, Yang P, Hou S, et al. IL-23R gene confers suscepti-

- bility to Behcet's disease in a Chinese Han population[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(7):1325-1328.
- [7] Figueroa Vega N, Alfonso Pérez M, Benedicto I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in hashimoto's thyroiditis[J]. Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2):953-962.
- [8] Torchinsky MB, Blander JM. T helper 17 cells: discovery, function, and physiological trigger[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(9):1407-1421.
- [9] McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo[J]. Nat Immunol, 2009, 10(3):314-324.
- [10] Morrison PJ, Sarah J. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity[J]. Immunology, 2011, 133:397-408.
- [11] Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, et al. IL23R and IL12B

SNPs and haplotypes strongly associate with crohn's disease risk in a New Zeal and population[J]. Gastroenterology Res Pract, 2010, 539461. doi:10.1155/2010/539461.

- [12] Duerr DH, Taylor KD, Brant SR, et al. "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene" [J]. Science, 2006, 314(5804):1461-1463.
- [13] Hu D, Hu G, Zhu J, et al. Association between polymorphisms of the IL-23R gene and allergic rhinitis in a Chinese Han population[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63858.
- [14] Karaderi T, Harvey D, Farrar C, et al. Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(4):386-389.

(收稿日期 2014-05-22)

(上接第 255 页)且在模拟胃液中释放量明显小于模拟肠液,说明该体系在 pH 值较高的体系中释放速率较快。蒙脱土可以作为药物载体必将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Bouxin F, Baumberger S, Pollet B, et al. Acidolysis of a lignin model: investigation of heterogeneous catalysis using montmorillonite clay[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(2):736-744.
- [2] Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs[J]. Drug Discov Today, 2007, 12(23):1068-1075.
- [3] Lertsutthiwong P, Noomun K, Khunthon S, et al. Influence of chitosan characteristics on the properties of biopolymeric chitosan-montmorillonite[J]. Prog Nat Sci, 2012, 22(5):502-508.
- [4] Nesic AR, Velickovic SJ, Antonovic DG. Characterization of chitosan/montmorillonite membranes as adsorbents for Bez-actv Orange V-3R dye[J]. J Hazard Mater, 2012, 209-210:256-263.
- [5] Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(7):645-666.
- [6] Costantino U, Ambrogio V, Nocchetti M, et al. Hydrotalcite-like compounds: versatile layered hosts of molecular anions with biological activity[J]. Microporous Mesoporous Mater,

2008, 107(1-2):149-160.

- [7] Monvisade P, Siriphannon P. Chitosan intercalated montmorillonite: preparation, characterization and cationic dye adsorption[J]. Appl Clay Sci, 2009, 42(3-4):427-431.
- [8] Sarier N, Onder E. Organic modification of montmorillonite with low molecular weight polyethylene glycols and its use in polyurethane nanocomposite foams, Thermochim[J]. Acta, 2010, 510:113-121.
- [9] Wu J, Li B, Liao J, et al. Behavior and analysis of cesium adsorption on montmorillonite mineral[J]. J Environ Radioact, 2009, 100(10):914-920.
- [10] Zheng JP, Luan L, Wang HY, et al. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system[J]. Appl Clay Sci, 2007, 36(4):297-301.
- [11] 陈有梅, 刘博, 周安宁, 等. 盐酸西替利嗪/蒙脱土纳米复合物的制备及其结构与性能[J]. 复合材料学报, 2010, 27(01):43-50.
- [12] Joshi GV, Patel HA, Kevadiya BD, et al. Montmorillonite intercalated with vitamin B as drug carrier[J]. Appl Clay Sci, 2009, 45(4):248-253.
- [13] Joshi GV, Kevadiya BD, Patel HA, et al. Montmorillonite as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of timolol maleate[J]. Int J Pharm, 2009, 374(1-2):53-57.
- [14] Reed-Hill RE, Abbaschian R. Physical metallurgy principles [M]. Boston: PWS-Kent Co, 1994:33-37.

(收稿日期 2014-06-03)