

论著·临床研究

IL-23受体和IL-17单核苷酸多态性与汉族早产儿坏死性小肠结肠炎的关系

张赟 李珂

(青海省妇女儿童医院新生儿科, 青海 西宁 810000)

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素-23受体(IL-23R)基因rs10889677位点、IL-17A基因rs2275913位点和IL-17F基因rs763780位点单核苷酸多态性(SNP)与汉族早产儿坏死性小肠结肠炎(NEC)的关系。**方法** 前瞻性选取2017年1月至2019年1月新生儿重症监护病房收治的100例汉族NEC早产儿为研究对象,其中Ⅱ期63例,Ⅲ期37例;另选取与NEC患儿胎龄、性别匹配的100例早产儿作为对照。采用PCR法和Sanger测序法鉴定rs10889677、rs2275913、rs763780位点的SNP。采用非条件logistic回归分析基因多态性与NEC易感性和病情严重程度的关系。**结果** rs10889677位点、rs2275913位点基因型和等位基因频率对NEC发病无影响($P>0.05$);rs763780位点基因型对NEC发病无影响($P>0.05$),但C等位基因携带者相对于T等位基因携带者的NEC发病风险为1.652倍(95%CI: 1.052~2.695, $P<0.05$)。TC+CC基因携带者相对于TT基因携带者的NEC发病风险为1.856倍(95%CI: 1.045~3.201, $P<0.05$)。TC+CC基因携带者相对于TT基因携带者的NECⅢ期的发生风险为2.965倍(95%CI: 1.052~6.330, $P<0.05$);C等位基因携带者相对于T等位基因携带者的NECⅢ期的发生风险为2.363倍(95%CI: 1.034~4.093, $P<0.05$)。**结论** IL-23R基因rs10889677位点和IL-17A基因rs2275913位点SNP与汉族早产儿的NEC易感性无关,IL-17F基因rs763780位点TC+CC基因型和C等位基因与NEC易感性和NEC病情严重程度有关。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(2): 141-145]

[关键词] 坏死性小肠结肠炎;白细胞介素-23受体;白细胞介素-17;基因多态性;早产儿

Association of interleukin-23 receptor and interleukin-17 single nucleotide polymorphisms with necrotizing enterocolitis in Chinese Han preterm infants

ZHANG Yun, LI Ke. Department of Neonatology, Women's and Children's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, China (Email: rtfnp@163.com)

Abstract: Objective To study the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of interleukin-23 receptor (IL-23R) rs10889677, interleukin-17A (IL-17A) rs227591, and interleukin-17F (IL-17F) rs763780 with necrotizing enterocolitis (NEC) in Chinese Han preterm infants. **Methods** A total of 100 Chinese Han preterm infants with NEC who were admitted to the neonatal intensive care unit from January 2017 to January 2019 were prospectively enrolled. Of the 100 preterm infants, 63 had stage II NEC and 37 had stage III NEC. A total of 100 preterm infants, matched for age and sex, were selected as the control group. PCR and Sanger sequencing were used to determine the SNPs of rs10889677, rs2275913, and rs763780. An unconditional logistic regression analysis was used to investigate the association of SNPs with NEC susceptibility and severity. **Results** The genotype and allele frequencies of rs10889677 and rs2275913 had no influence on the development of NEC ($P>0.05$). The genotype of rs763780 had no influence on the development of NEC ($P>0.05$), but the risk of NEC in the infants carrying C allele was 1.652 times that in those carrying T allele (95%CI: 1.052-2.695, $P<0.05$). The risk of NEC in the infants carrying TC+CC genotype was 1.856 times that in those carrying TT genotype (95%CI: 1.045-3.201, $P<0.05$). The risk of stage III NEC in the infants carrying TC+CC genotype was 2.965 times that in those carrying TT genotype (95%CI: 1.052-6.330, $P<0.05$). The risk of stage III NEC in the infants carrying C allele was 2.363 times that in

[收稿日期] 2019-09-23; [接受日期] 2020-01-16

[基金项目] 青海省科技厅医药卫生专项基金(RUY877009)。

[作者简介] 张赟,女,本科,主治医师。Email: rtfnp@163.com。

those carrying T allele (95%CI: 1.034-4.093, $P < 0.05$). **Conclusions** The SNPs of IL-23R rs10889677 and IL-17A rs2275913 are not associated with the susceptibility to NEC in Chinese Han preterm infants, while TC+CC genotype and C allele of IL-17F rs763780 are associated with the susceptibility to NEC and the severity of NEC.

[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(2): 141-145]

Key words: Necrotizing enterocolitis; Interleukin-23 receptor; Interleukin-17; Gene polymorphism; Preterm infant

坏死性小肠结肠炎 (necrotizing enterocolitis, NEC) 是新生儿期常见的消化系统危重症, 活产儿 NEC 发病率为 1%~3%^[1]。NEC 的发病机制尚未明了, 可能与遗传易感性、肠道发育不成熟、喂养方式、菌群失调、循环障碍和输血等有关^[2]。NEC 的遗传易感性是近年来研究的热点, 特别是免疫炎症因子的基因多态性引起了国内外学者广泛关注^[3-5]。既往研究发现, 白细胞介素 (interleukin, IL) -23/IL-17 轴对调节肠道免疫炎症具有重要作用^[6]。IL-23 受体 (IL-23R) 在活化的 T 细胞中高度表达, 对激活 Th17 分泌 IL-17 有重要作用^[7]。IL-17 活化后, 可招募各种趋化因子和炎症因子而介导免疫炎症反应^[8]。另外, IL-17 可以通过 Toll 样受体 4 (TLR4) 而损害肠上皮细胞的紧密连接, 增加上皮细胞凋亡并减少增殖, 进而促进 NEC 的发生^[9]。NEC 新生儿血清 IL-17 表达水平明显升高, 并且可以预测患儿 60 d 内病死率^[10]。IL-23R 和 IL-17 基因变异可影响其蛋白水平表达, 进而影响其生物学功能。既往研究发现 IL-23R 和 IL-17 基因变异与多种肠道疾病有关, 如克罗恩病和溃疡型结肠炎等^[7], 但是未见关于 NEC 的报道。为了排除种族对本研究结果的影响, 本研究仅选取汉族患儿为研究对象。本研究旨在探讨 IL-23R 基因 rs10889677 位点、IL-17A 基因 rs2275913 位点和 IL-17F 基因 rs763780 位点单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 与汉族早产儿 NEC 易感性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究为前瞻性研究, 选取 2017 年 1 月至 2019 年 1 月于本院新生儿重症监护病房收治的 100 例符合纳入及排除标准的 NEC 患儿为研究对象并纳入 NEC 组。纳入标准: (1) 胎龄 <37 周; (2) 汉族; (3) 根据临床表现、影像学资料和病理资料等确诊为 NEC^[11]。排除标准: (1) 合并感染性疾病或胃肠道炎症;

(2) 先天性肠道畸形; (3) 先天性遗传代谢性疾病; (4) 有缺氧窒息等病史。100 例 NEC 患儿中, 男 59 例, 女 41 例, 胎龄 34.2 ± 2.0 周, 出生时体重 2356 ± 362 g; 根据 NEC 分期标准^[11], II 期 63 例, III 期 37 例。另选取 100 例早产儿作为对照。纳入标准: (1) 胎龄 <37 周; (2) 汉族; (3) 无严重基础疾病。排除标准同 NEC 组。100 例对照组早产儿中, 男 54 例, 女 46 例, 胎龄 34.7 ± 2.4 周, 出生时体重 2396 ± 511 g。两组性别、胎龄和出生时体重的比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究已经过我院医学伦理委员会批准, 所有新生儿监护人均签署知情同意书。

1.2 样本采集

NEC 组患儿在确诊后 4 h 内, 对照组患儿在住院期间, 分别采集外周静脉血 1 mL 置于 EDTA 管中, 用 1.5 mL EP 管分装, 置于 -70°C 冰箱中保存。

1.3 DNA 分离与基因分型

采用 Qiagen 试剂盒 (北京赛因坦科技有限公司) 提取总 DNA。用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由上海桑根生物技术研究所在进行合成。所选 SNP 位点包括 IL-23R 基因 rs10889677 位点、IL-17A 基因 rs2275913 位点和 IL-17F 基因 rs763780 位点。rs10889677: F: 5'-CAATCTTGTTCAGAGTAGTGAC-3', R: 5'-AAAAATACATGAGGCGTCCA-3'; rs2275913: F: 5'-TATTGACCCATAGCATAGCAGC-3', R: 5'-TTTCTCCTTCTGTGCTACTTAC-3'; rs763780: F: 5'-AGGGAATTGGGGGTCAGA-3', R: 5'-GTTCCCATCCAGCAAGAGA-3'。PCR 反应体系: 上下游引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $0.8 \mu\text{L}$, ROX reference dye ($50 \times$) $0.4 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $2.0 \mu\text{L}$, ddH₂O $6 \mu\text{L}$, 总扩增体系为 $10 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环; 72°C 最后延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定后的产物用 ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪进行测序 (Sanger 测序法)^[12]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析。正态分布计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组计量资料间的比较采用两独立样本 *t* 检验; 计数资料采用百分率 (%) 表示, 两组计数资料间的比较采用卡方检验; 采用非条件 logistic 回归分析基因多态性与 NEC 易感性和病情严重程度的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因多态性与 NEC 易感性分析

IL-23R 基因 rs10889677 位点、IL-17A 基因 rs2275913 位点和 IL-17F 基因 rs763780 位点的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (分别 $\chi^2=1.072$ 、

1.416、2.081; 分别 $P=0.342$ 、0.501、0.153)。图 1 所示为 rs10889677 位点、rs2275913 位点和 rs763780 位点 SNP。以是否患病为因变量, 以基因型或等位基因为自变量进行 logistic 回归分析, 评估基因型及等位基因频率对 NEC 发病的影响。rs10889677 位点、rs2275913 位点基因型和等位基因频率对 NEC 发病无影响 ($P > 0.05$); rs763780 位点基因型对 NEC 发病无影响 ($P > 0.05$), 但 C 等位基因携带者相对于 T 等位基因携带者的发病风险为 1.652 倍 (95%CI: 1.052~2.695, $P < 0.05$) (表 1)。NEC 组 rs763780 位点 TC+CC 基因频率为 35%、TT 基因频率为 65%; 对照组 TC+CC 基因频率为 22%, TT 基因型为 78%; TC+CC 基因携带者相对于 TT 基因携带者的发病风险为 1.856 倍 (95%CI: 1.045~3.201, $P=0.039$)。

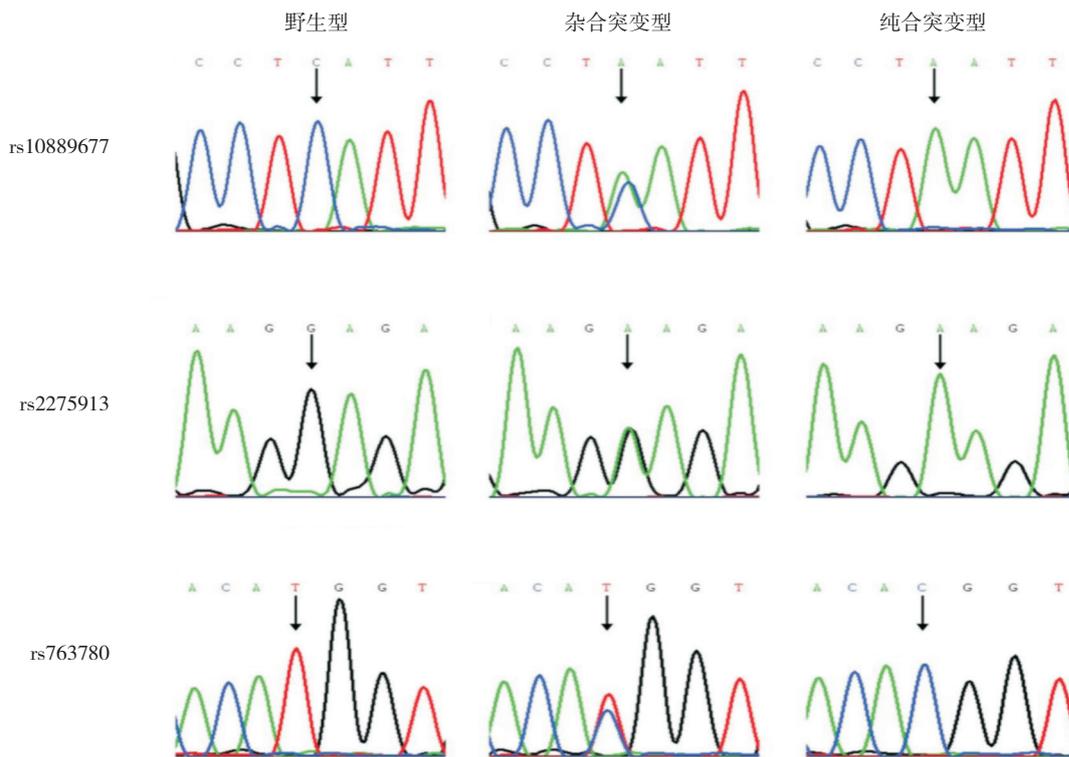


图 1 IL-23R 基因 rs10889677 位点、IL-17A 基因 rs2275913 位点和 IL-17F 基因 rs763780 位点单核苷酸多态性 箭头所示为突变位点。

2.2 rs763780 位点基因多态性与 NEC 病情严重程度分析

以是否出现 NEC III 期为因变量, 以 rs763780 位点基因型或等位基因为自变量进行 logistic 回归分析, 评估 rs763780 位点基因型及等位基因频率对 NEC 病情严重程度的影响。TC+CC 基因携带者

相对于 TT 基因携带者的 NEC III 期的发生风险为 2.965 倍 (95%CI: 1.052~6.330, $P < 0.05$)。C 等位基因携带者相对于 T 等位基因携带者的 NEC III 期的发生风险为 2.363 倍 (95%CI: 1.034~4.093, $P < 0.05$)。见表 2。

表1 NEC组和对照组IL-23R基因rs10889677、IL-17A基因rs2275913和IL-17F基因rs763780位点基因型和等位基因分布频率比较 [例(%)]

| 组别 | n | rs10889677 基因型 | | | rs10889677 等位基因 | | rs2275913 基因型 | | |
|-----------|-----|----------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| | | CC | CA | AA | C | A | GG | GA | AA |
| 对照组 | 100 | 15(15.0) | 45(45.0) | 40(40.0) | 75(37.5) | 125(62.5) | 26(26.0) | 58(58.0) | 16(16.0) |
| NEC组 | 100 | 17(17.0) | 47(47.0) | 36(36.0) | 81(40.5) | 119(59.5) | 23(23.0) | 66(66.0) | 11(11.0) |
| OR(95%CI) | | 1 | 0.913 (0.451~1.864) | 0.750 (0.413~1.582) | 1 | 0.853 (0.620~1.182) | 1 | 1.338 (0.692~2.014) | 0.862 (0.411~1.873) |
| P值 | | - | 0.862 | 0.467 | - | 0.362 | - | 0.296 | 0.652 |

| 组别 | n | rs2275913 等位基因 | | rs763768 基因型 | | | rs763768 等位基因 | |
|-----------|-----|----------------|------------------------|--------------|------------------------|------------------------|---------------|------------------------|
| | | G | A | TT | TC | CC | T | C |
| 对照组 | 100 | 110(55.0) | 90(45.0) | 78(78.0) | 22(22.0) | 0(0) | 178(89.0) | 22(11.0) |
| NEC组 | 100 | 112(56.0) | 88(44.0) | 65(65.0) | 32(32.0) | 3(3.0) | 162(81.0) | 38(19.0) |
| OR(95%CI) | | 1 | 1.000 (0.586~1.254) | 1 | 1.783 (0.344~2.687) | 0.536 (0.524~1.968) | 1 | 1.652 (1.052~2.695) |
| P值 | | - | 0.864 | - | 0.483 | 0.125 | - | 0.042 |

表2 不同NEC病情严重程度患儿IL-17F基因rs763780位点基因型和等位基因分布频率比较 [例(%)]

| 病情分期 | n | rs763780 基因型 | | rs763780 等位基因 | |
|-----------|----|--------------|------------------------|---------------|------------------------|
| | | TT | TC+CC | T | C |
| NEC II期 | 63 | 52(83) | 11(17) | 115(91) | 11(9) |
| NEC III期 | 37 | 13(35) | 24(65) | 47(64) | 27(36) |
| OR(95%CI) | | 1 | 2.965 (1.052~6.330) | 1 | 2.363 (1.034~4.093) |
| P值 | | - | 0.041 | - | 0.038 |

3 讨论

NEC是新生儿期严重的胃肠道疾病,是早产儿死亡的重要原因之一^[4]。NEC的发病与多种因素有关,但是均不能完全解释早产儿易感和疾病严重的原因。近年来,遗传易感性引起了国内外学者的重视^[4]。由于基因背景不同,本研究仅以汉族新生儿为研究对象。鉴于IL-23/IL-17轴调节肠道免疫炎症的重要作用,本研究分析了IL-23R基因rs10889677位点、IL-17A基因rs2275913位点和IL-17F基因rs763780位点SNP与汉族早产儿NEC易感性的关系。研究结果显示,IL-23R基因rs10889677位点和IL-17A基因rs2275913位点SNP与NEC易感性无关,然而IL-17F基因rs763780位点TC+CC基因型和C等位基因与NEC易感和病情严重程度有关。

IL-23/IL-17轴对调节肠道免疫炎症具有重要

作用^[6]。IL-23属于新型细胞因子,与IL-23R结合后可以激活并维持Th17反应,以协调炎症因子级联反应,进而促进炎症性肠病的发生及发展^[12]。IL-23R在活化的T细胞中高度表达,可以降解紧密连接蛋白,对肠道屏障产生影响,对激活Th17分泌IL-17有重要作用^[7]。IL-17家族有6个成员,包括IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F。IL-17活化后,可招募各种趋化因子和炎症因子而介导免疫炎症反应^[9]。另外,IL-17可以通过TLR4而损害肠上皮细胞的紧密连接,增加上皮细胞凋亡并减少增殖,进而促进NEC的发生^[13]。

IL-17F是近年来发现的IL-17家族新成员,与IL-17A的同源性最强^[14]。既往研究发现IL-17A基因rs2275913位点和IL-17F基因rs763780位点SNP与免疫炎症密切相关^[15-17]。有研究发现IL-23R和IL-17基因变异与多种肠道疾病有关,如克罗恩病和溃疡型结肠炎等^[7],然而本研究中仅IL-17F基因rs763780位点变异与NEC易感性有关。多项研究表明,IL-23R基因rs10889677位点与炎症性肠病有关^[18]。然而本研究并未发现IL-23R基因rs10889677位点SNP与NEC易感性有关,这可能是因为IL-23/IL-17轴并不是调节Th-17分泌IL-17的唯一途径。有研究发现,TLR4下游通路会影响CD4⁺Th17细胞极化,进而增加IL-17分泌,导致NEC的发生^[12]。IL-23/IL-17轴可能在NEC发生和发展中失活,这需要未来进一步探讨。

本研究进一步分析了 IL-17F 基因 rs763780 位点 SNP 与疾病严重程度的关系。采用 Bell 分期, 100 例 NEC 患儿中 II 期 63 例, III 期 37 例。基因多态性与 NEC 病情严重程度的关系既往已得到证实, 例如既往研究发现 VEGFA 基因 rs699947、rs833061 位点 SNP, HB-EGF 基因 rs4912711 位点 SNP 与 NEC 严重程度有关^[19-20]。本研究 logistic 回归分析结果显示, NEC III 期患儿 TC+CC 基因型分布频率明显高于 NEC II 期患儿, 说明携带至少一个 C 等位基因的 NEC 患儿病情更为严重。

本研究的局限性为: (1) 本研究中对照组 rs763780 位点 CC 基因型分布频率为 0, 可能与样本量较小有关, 需要未来扩大样本量并进行多中心研究。(2) 本研究未分析基因多态性与 NEC 预后的关系, 需要进一步随访。(3) 虽然 IL-23/IL-17 轴与炎症性肠病密切相关, 但是本研究并未发现 NEC 组和对照组 rs10889677 位点、rs2275913 位点基因型和等位基因分布频率的差异, 可能是因为 IL-23/IL-17 轴可能在 NEC 发生和发展中失活, 而本研究未检测患儿血清中 IL-23 和 IL-17 的表达水平, 需要未来进一步分析。(4) 为了排除种族差异对基因多态性的影响, 本研究仅选取了汉族早产儿作为研究对象, 在下一步的研究中将选取不同民族早产儿作为研究对象, 观察 IL-23R 和 IL-17 基因 SNP 与不同民族早产儿 NEC 的关系。

综上所述, 本研究结果显示 IL-23R 基因 rs10889677 位点和 IL-17A 基因 rs2275913 位点 SNP 与汉族早产儿的 NEC 易感性无关, IL-17F 基因 rs763780 位点 TC+CC 基因型和 C 等位基因与 NEC 易感和 NEC 病情严重程度有关。

[参 考 文 献]

- [1] Patel RM, Underwood MA. Probiotics and necrotizing enterocolitis[J]. *Semin Pediatr Surg*, 2018, 27(1): 39-46.
- [2] Eaton S, Rees CM, Hall NJ. Current research on the epidemiology, pathogenesis, and management of necrotizing enterocolitis[J]. *Neonatology*, 2017, 111(4): 423-430.
- [3] Treszl A, Heninger E, Kalman A, et al. Lower prevalence of IL-4 receptor alpha-chain gene G variant in very-low-birth-weight infants with necrotizing enterocolitis[J]. *J Pediatr Surg*, 2003, 38(9): 1374-1378.
- [4] Cuna A, Sampath V. Genetic alterations in necrotizing enterocolitis[J]. *Semin Perinatol*, 2017, 41(1): 61-69.
- [5] 袁媛, 周伟, 袁伟明, 等. MD-2 和 GM2A 基因多态性与新生儿坏死性小肠结肠炎的关系[J]. *中国新生儿科杂志*, 2015, 30(1): 3-8.
- [6] Babaie F, Hasankhani M, Mohammadi H, et al. The role of gut microbiota and IL-23/IL-17 pathway in ankylosing spondylitis immunopathogenesis: new insights and updates[J]. *Immunol Lett*, 2018, 196: 52-62.
- [7] Kim SW, Kim ES, Moon CM, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 2011, 60(11): 1527-1536.
- [8] Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging[J]. *Ann Surg*, 1978, 187(1): 1-7.
- [9] Ma F, Li S, Gao X, et al. Interleukin-6-mediated CCR9⁺ interleukin-17-producing regulatory T cells polarization increases the severity of necrotizing enterocolitis[J]. *EBioMedicine*, 2019, 44: 71-85.
- [10] Lawrence SM, Ruoss JL, Wynn JL. IL-17 in neonatal health and disease[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 79(5): e12800.
- [11] 金汉珍. 新生儿坏死性小肠结肠炎[M]// 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学(上册). 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 475.
- [12] McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD[J]. *Gut*, 2007, 56(10): 1333-1336.
- [13] Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria[J]. *Pediatr Clin North Am*, 1986, 33(1): 179-201.
- [14] Luo Y, Luo J, Peng H. Associations between genetic polymorphisms in the VEGFA, ACE, and SOD2 genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2019, 23(9): 644-651.
- [15] 刘杰, 周晓慧, 史乾, 等. IL-17 家族细胞因子的功能及其在相关疾病中的作用[J]. *现代免疫学*, 2014, 34(3): 262-265.
- [16] Hammad A, Mosaad YM, Hammad EM, et al. Interleukin-17A rs2275913, Interleukin-17F rs763780 and rs2397084 gene polymorphisms as possible risk factors in Juvenile lupus and lupus related nephritis[J]. *Autoimmunity*, 2016, 49(1): 31-40.
- [17] Jiang L, Zhou X, Xiong Y, et al. Association between interleukin-17A/F single nucleotide polymorphisms and susceptibility to osteoarthritis in a Chinese population[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(12): e14944.
- [18] Eskandari-Nasab E, Moghadampour M, Tahmasebi A. Meta-analysis of risk association between interleukin-17A and F gene polymorphisms and inflammatory diseases[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2017, 37(4): 165-174.
- [19] Egan CE, Sodhi CP, Good M, et al. Toll-like receptor 4-mediated lymphocyte influx induces neonatal necrotizing enterocolitis[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 495-508.
- [20] Gao X, Ma F, Hao H, et al. Association of VEGFA polymorphisms with necrotizing enterocolitis in Chinese Han population[J]. *Pediatr Neonatol*, 2019, 60(2): 129-134.

(本文编辑: 万静)