

白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性与胰岛素抵抗的关系

杨冀衡¹, 罗国辉¹, 陆泽元², 胡雪松¹, 新霞¹, 张东辉¹, 许香广¹

(广东医学院附属福田人民医院 1. 心内科, 2. 内分泌科, 广东省深圳市 518033)

[关键词] 内科学; 胰岛素抵抗; 聚合酶链反应-限制片段长度多态性; 白细胞介素 6; 基因多态性, 白细胞介素 6-174G/C; 基因型; 等位基因

[摘要] 目的 了解中国南方汉族人白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性与胰岛素抵抗的关系。方法 应用聚合酶链反应-限制片段长度多态性分析方法测定了 69 例胰岛素抵抗指数高值者和 69 例胰岛素抵抗指数低值者的白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性, 并结合血压、血糖、血脂等相关指标进行横断面分析。结果 中国南方汉族人白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性以 GG 纯合子基因型为主, 分布频率为 136/138 (98.55%), GC 杂合子基因型分布频率为 2/138 (1.45%), CC 突变基因型未发现, 各基因型与胰岛素抵抗指数无相关性。结论 中国南方汉族人白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性与胰岛素抵抗可能无关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship of Interleukin-6 Gene 174G/C Polymorphism and Insulin Resistance

YANG Ji-Heng¹, LUO Guo-Hui¹, LU Ze-Yuan², HU Xue-Song¹, XIN Xia¹, ZHANG Dong-Hui¹, and XU Xiang-Guang¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Endocrinology; the Affiliated Futian People's Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen 518033, China)

[KEY WORDS] Insulin Resistance; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism; Interleukin-6; Genotype; Allele

[ABSTRACT] **Aim** To understand the relationship of interleukin-6 gene 174G/C polymorphism and insulin resistance in Han people in south China. **Methods** Interleukin-6 gene 174G/C polymorphism were detected in 69 patients with high insulin resistance index and 69 control with low insulin resistance index by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analytical method, meanwhile, combined with blood pressure, plasma glucose, blood fat, et al to undertake cross-sectional study. **Results** In Han people in south China, interleukin-6 gene 174G/C polymorphism main was G/G homogenotype and distribution frequency was 136/138 (98.55%), G/C heterogenotype distribution frequency was 2/138 (1.45%), C/C mutant genotype had not been found. There was no relationship between the kinds of genotype and insulin resistance index. **Conclusion** Maybe there is no relationship between interleukin-6 gene 174G/C polymorphism and insulin resistance in Han people in south China.

研究发现白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 参与胰岛素抵抗的形成。文献[1]报道, IL-6 基因 5' 侧 174G/C 存在多态性, 且与白细胞介素 6 的生成量有关^[2]。由此推测, IL-6 基因 174G/C 的多态性可能与胰岛素抵抗有关。本文对国人的 IL-6 基因多态性进行检测, 旨在探讨 IL-6 基因 174G/C 的多态性与胰岛素抵抗的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象与分组

138 例受检者均为无血缘关系的中国南方汉族人。根据稳态模式胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment insulin resistance index, HOMA-IRI) 分为 HOMA-IRI 高值组和 HOMA-IRI 低值组。HOMA-IRI 高值组 69 例, 其中男性 40 例, 女性 29 例, 年龄 41.2 ± 9.8 岁。HOMA-IRI 低值组 69 例, 其中男性 51 例, 女性 18 例, 年龄 37.2 ± 7.4 岁。

1.2 基因组 DNA 的抽提

取外周静脉 EDTA 抗凝血 2 mL, 低渗溶血法收集白细胞, 酚/氯仿法提取基因组 DNA, 适量 TE 液溶解, 置于 -70°C 低温冰箱保存。

1.3 白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性的检测

采用聚合酶链反应-限制片段长度多态性 (polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 基因分析方法检测 IL-6 基因 174G/C 多态性。

[收稿日期] 2004-12-07 [修回日期] 2005-01-11

[基金项目] 深圳市科技局基金(200204136)资助

[作者简介] 杨冀衡, 副主任医师, 广东医学院附属福田人民医院心研所副所长, 从事高血压、冠心病及代谢综合征的临床防治及研究。罗国辉, 主管检验师, 主要从事高血压、冠心病及血栓性疾病的分子生物学及血栓形成研究。

1.3.1 引物设计 参照文献[2], 设计上游引物 P1 为 5'-ACT TCG TGC ATG ACT TCA GC-3' 下游引物 P2 为 5'-CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG-3' (深圳益生堂科技有限公司合成)。

1.3.2 聚合酶链反应体系 反应总体积 50 μ L, TaqDNA 聚合酶 2 U, dNTP 200 μ mol/L, 模板 DNA 3 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 45 s \rightarrow 52 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环 35 次。PCR 产物经 2.5% 琼脂糖电泳, 溴乙啶染色, 紫外透射仪观察, 扩增成功可见一条特异的 DNA 片段 (208 bp)。

1.3.3 酶切反应电泳分析 扩增成功的 PCR 产物采用上海中科开瑞公司生产的 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 50 μ L PCR 产物最终用 50 μ L 灭菌双蒸水洗脱, 按下列体系进行酶切反应。10 \times buffer 1 μ L, 10 Mu/L MBI 公司限制性内切酶 (SfaNI) 0.2 μ L, 纯化 PCR 产物 8.8 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应 3.5 h, 加入 2 μ L 上样缓冲液, 取 10 μ L 酶切产物进行电泳, 溴乙啶染色, 紫外透射仪观察。

1.4 白细胞介素 6 等指标测定

白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 采用美国 GeneMay 公司 ELISA 产品, 每一样本双孔测定并取平均值。在 MAXM 血细胞分类分析仪上检测白细胞总数, 批内变异系数为 1.71%, 批间变异系数为 4.20%。在 Bechman LX20 仪上采用酶法测定总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) 和口服 75g 葡萄糖后 2 h 血糖 (2hPG)。

1.5 胰岛素抵抗性测定

空腹胰岛素 (fasting insulin, FIns) 的血清标本存放于 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱内, 以放射免疫法 (天津协和医药科技有限公司) 一次性用双管测定, 取其平均值, 批内变异 < 4.5%。参照文献[2], 胰岛素抵抗性用稳态模式胰岛素抵抗指数 (Homeostasis model assessment insulin resistance index, HOMA-IRI) 来评价, $HOMA-IRI = FPG \times FIns / 22.5$

1.6 统计学方法

所有资料采用 SPSS10.0 进行统计分析。TG、FIns 和 HOMA-IRI 呈偏态分布, 以 M (QR) 表示, M 为中位数, QR 为第三与第一的四分位数间距, 经自然对数转换后分析。两组间比较用 *t* 检验, 构成比用卡方检验, 对 HOMA-IRI 高低值组基因型间比较采取 Fisher 精确概率法进行比较。

2 结果

2.1 两组各项指标的比较

两组各项相关指标的测定结果见表 1 (Table 1)。可见由于 HOMA-IRI 的差异 ($P < 0.001$), 两组在白细胞总数 ($P < 0.01$)、体质指数 ($P < 0.001$)、腰围 ($P < 0.001$)、腰臀比 ($P < 0.01$)、高密度脂蛋白胆固醇 ($P < 0.05$)、收缩压 ($P < 0.001$)、舒张压 ($P < 0.001$)、FPG ($P < 0.01$)、2hPG ($P < 0.01$)、TNF α ($P < 0.001$)、IL-6 ($P < 0.001$)、TG ($P < 0.001$) 和 FIns ($P < 0.001$) 等都存在显著性差异。

表 1. 两组各项指标的比较

Table 1. Comparison of indexes in high and low HOMA-IRI groups

| 指标 | HOMA-IRI 低值组 | HOMA-IRI 高值组 |
|-------------------------|------------------|-------------------------------|
| 例数 (男/女) | 51/18 | 40/29 |
| 年龄 (岁) | 37.2 \pm 10.4 | 41.2 \pm 9.8 |
| 白细胞总数 ($\times 10^9$) | 5.62 \pm 1.39 | 6.61 \pm 1.68 ^b |
| 体质指数 (kg/m^2) | 22.9 \pm 4.1 | 26.5 \pm 3.4 ^c |
| 腰围 (cm) | 78.9 \pm 8.6 | 87.7 \pm 7.9 ^c |
| 腰臀比 | 0.86 \pm 0.02 | 0.90 \pm 0.02 ^b |
| TC (mmol/L) | 4.72 \pm 0.89 | 5.02 \pm 0.91 |
| LDLC (mmol/L) | 2.20 \pm 0.68 | 2.22 \pm 0.75 |
| HDLC (mmol/L) | 1.27 \pm 0.30 | 1.15 \pm 0.29 ^a |
| 收缩压 (mmHg) | 108.9 \pm 12.1 | 119.9 \pm 15.9 ^c |
| 舒张压 (mmHg) | 71.9 \pm 9.6 | 78.3 \pm 11.0 ^c |
| FPG (mmol/L) | 5.16 \pm 0.59 | 5.70 \pm 0.93 ^b |
| 2hPG (mmol/L) | 6.38 \pm 2.44 | 7.36 \pm 2.80 ^b |
| TNF α (ng/L) | 17.0 \pm 8.7 | 24.0 \pm 11.3 ^c |
| IL-6 (ng/L) | 4.78 \pm 3.81 | 6.53 \pm 4.19 ^c |
| TG (mmol/L) | 0.96 (0.68) | 1.77 (1.64) ^c |
| FIns (mIU/L) | 9.46 (4.32) | 15.90 (9.96) ^c |
| HOMA-IRI | 2.30 (1.05) | 3.93 (2.11) ^b |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, 与 HOMA-IRI 低值组比较。

2.2 白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性分布

白细胞介素 (IL-) 6 基因 174 位点有三种基因型: GG 纯合子 2 条 DNA 片段长度分别为 156 bp 和 52 bp, GC 杂合子 3 条 DNA 片段长度分别为 208 bp、156 bp 和 52 bp, CC 纯合子 1 条 DNA 片段长度为 208 bp。我组只发现 GG 及 GC 二种基因型, 未发现 CC 基因型 (图 1, Figure 1)。两组基因型及等位基因频率见表 2 (Table 2)。采用 Fisher 精确概率法比较, 差异无显著性统计学意义 ($P = 0.496$)。

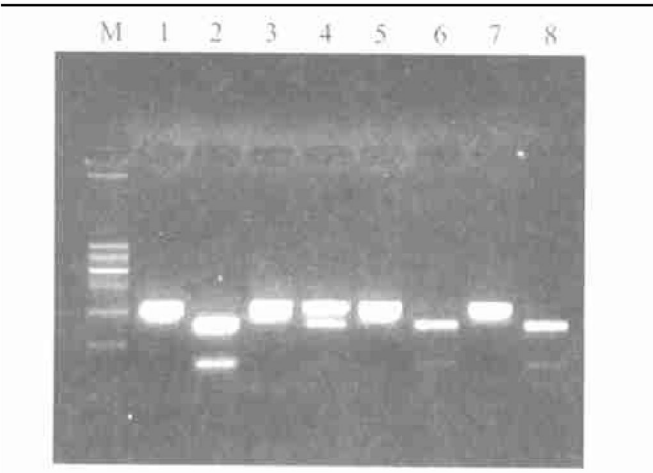


图 1. 白细胞介素 6 基因 174G/C 位点基因型图谱 2、4、6 和 8 为未酶切图, 3、7 和 9 为 GG 基因型, 5 为 GC 基因型。

Figure 1. The genotype atlas of interleukin-6 gene 174G/C polymorphism

表 2. 两组白细胞介素 6 基因 174G/C 多态性的分布
Table 2. Distribution of interleukin-6 gene 174G/C polymorphism in high and low HOMA-IRI groups

| 分 组 | 基因型(例) | | | 等位基因频率(%) | |
|--------------|--------|-----|-----|-----------|---------|
| | G/G | G/C | C/C | C | G |
| HOMA-IRI 高值组 | 69 | 2 | 0 | 1.409% | 98.591% |
| 其中: 男性 | 40 | 2 | 0 | 2.439% | 97.561% |
| 女性 | 29 | 0 | 0 | 0 | 100% |
| HOMA-IRI 低值组 | 69 | 0 | 0 | 0 | 100% |
| 其中: 男性 | 51 | 0 | 0 | 0 | 100% |
| 女性 | 18 | 0 | 0 | 0 | 100% |

经频率检验 FISH 特殊性 P= 0.496, 两组无显著性差异。

2.3 白细胞介素 6 基因测序

我们对白细胞介素 6 基因 G/G, G/C 基因型样本进行测序, 得出的结论与酶切结果一致。

3 讨论

最近研究显示 IL6 在胰岛素抵抗患者中升高, 提示 IL6 参与胰岛素抵抗的形成。IL-6 来源于巨噬细胞、脂肪细胞或内皮细胞。胰岛素抵抗以及胰岛素分泌不足引起的高血糖均可促进胰岛细胞分泌大量的 IL-6, 进而促进 B 淋巴细胞分化和 T 淋巴细胞过度激活, 与其他细胞因子和效应细胞产生的细胞毒作用结合, 可以引起胰岛 β 细胞死亡, 加重胰岛素抵抗^[2, 3]。IL6 还可以增加葡萄糖摄取, 降低胰岛素敏感性^[1, 4]。本研究中 HOMA-IR 高值组 IL6 高

于低值组, 与文献相符。

1998 年 Fishman 等^[5]首次报道 IL-6 基因 5' 侧 174 位核苷酸位点上存在胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)的多态性, 并对刺激物如内毒素和白细胞介素 1(interleukin, IL-1)的刺激存在不同的转录率, 等位基因 C 的纯合子(C/C)形成 IL-6 减少, 而等位基因 G 的纯合子(G/G)和杂合子(G/C)形成 IL-6 增多, 由此推论 IL-6 基因多态性与胰岛素抵抗有关。Fernandez-Real 等^[6]报道证实等位基因 C 的纯合子胰岛素敏感性较等位基因 G 的纯合子和杂合子高。

本研究结果与 Fernandez-Real 等^[7]研究不同, 这两位学者发现 174G/C 多态性同欧美人群胰岛素抵抗有直接的关系。本研究提示国人中 IL6 基因 174G/C 多态性存在与欧美人种完全不同的频率分布特征。结论不一致的可能原因有: ①174G/C 多态性存在种族差异, 国人 174 位点多态性频率等位基因 C 仅占 1.409%, 明显不同于欧美人群, 后者 CC 基因型占 20%~40%, C 等位基因为常见基因, 频率在 40% 左右; ②174G/C 多态性是 IL6 基因多态性研究的热点, 目前陆续有该位点多态性与动脉粥样硬化的危险因素的报道, 但国人中 IL6 基因 174 位点几乎均为 GG 基因型, 明显不同于欧美人群, 这种种族间的遗传背景差异有可能招致同一种突变在不同人群产生不同的表型效应。它不影响 IL6 基因启动子区现已知的任何 DNA 结合序列, 不过不排除 174G/C 多态性通过未知的 DNA 结合序列或 DNA 二级结构影响 IL6 基因的表达调控的可能, 但尚需 174G/C 多态性的功能性研究加以证实。本研究结果与国内的相关报道大致相同^[8, 9], 因此更有力支持我们的种族 174G/C 多态性确实与欧美人种不同, 但与日韩等等国的研究结果接近^[10], 显示东方人群中 C 等位基因的分布频率要低于西方人群。③中国人 IL6 基因 174 位点几乎均为 GG 基因型, G/C 及 C/C 研究的样本量不够大, 不能说明这些素材是否真正代表基因多态性与胰岛素抵抗的相关性。

Fernandez-Real 等^[7]随后又报道 IL-6 基因多态性也与血脂代谢有关, 等位基因 C 的纯合子其空腹甘油三酯和游离脂肪酸较等位基因 G 的纯合子和杂合子者为低。而高密度脂蛋白的变化则相反。我们的研究结果证实了这一点, 结果显示 HOMA-IR 与肥胖指标 BMI、WC、WHR 正相关, 与糖代谢指标餐后 2h 血糖正相关, 与脂代谢指标 TG 正相关、HDL-C 负相关, 与血压指标收缩压、舒张压正相关^[11]。但经对 TG 高、低值组间采取 Fisher 精确概率法进行比较发现 TG 与 IL6 基因多态性没有关系。

综上所述, 我们在中国汉族人群中探讨 IL6 基

因的多态性,发现 IL6 基因 174G/C 多态性与胰岛素抵抗可能无关。

[致谢] 深圳市益生堂创益生物科技有限公司设计引物、提供基因检测及测序设备。

[参考文献]

- [1] Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 1997, **40**: 1 286-292
- [2] Fern•ndez Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endo Meta*, 2000, **85**: 1 334-339
- [3] Pickup JC, Crook MA. Is type 2 diabetes mellitus a disease of the innate immune system. *Diabetologis*, 1998, **41**: 1 241-248
- [4] Zeidler C, Kanz L, Hurkuck F, Rittmann KL, Wildfang I, Kadoya T, et al. In vivo effects of interleukin-6 on thrombopoiesis in healthy and irradiated primater. *Blood*, 1992, **80**: 2 740-745
- [5] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed -Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (*IL-6*) gene on *IL-6* transcription and plasma *IL-6* levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, 1998, **102**: 1 369-376
- [6] Fern•ndez Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Pugeat M, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2000, **49**: 517-520
- [7] Fern•ndez Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85**: 1 334-339
- [8] 杨超, 李艳, 张平安, 蒋学俊, 黄从新. 冠心病患者白细胞介素 6 基因 174G/C 的多态性研究. *四川医学*, 2004, **25** (4): 404-406
- [9] 付海霞, 李庚山, 李艳, 张平安, 李建军, 夏冷, 等. 冠心病与白细胞介素 6 基因 572C/G 多态性的相关性. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 557-560
- [10] Lim CS, Zheng S, Kim YS, Ahn C, Han JS, Kim S, et al. The 174G to C polymorphism of interleukin-6 gene is very rare in Korean. *Cytokine*, 2002, **19** (1): 52-54
- [11] 杨冀衡, 陆泽元, 罗国辉, 胡雪松, 张东辉, 许香广. 白细胞总数与心血管病主要危险因素的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 571-573

(此文编辑 胡必利)