

IL-1Ra 基因多态性与无症状细菌性阴道病自然转归关系的研究

张 瑞,高佳惠子,董翰宇,李 昶,尹海旭

摘要 目的 研究白细胞介素 1 受体 a(IL-1Ra) 基因多态性与无症状细菌性阴道病(aBV) 患者不同转归的关系,以期对 aBV 患者进行分组管理。方法 对 aBV 患者进行自然转归的研究,在入组时,所有患者均留取了一份静脉血标本和阴道灌洗液的标本单独冻存。4 个月后,临床研究结束时,根据临床结局,将完成研究的患者分为 3 组:自愈、进展和无改变。再检测所有患者 IL-1Ra 基因多态性以及阴道微环境中 IL-1 β 和 IL-1Ra 浓度,并比对上述指标在 3 组不同结局的患者间的差别。结果 共有 1 014 例中国汉族女性患者入组,984 例完成临床随访并获得临床结局数据。其中 13 例患者的冻存标本在检测时无法使用,共有 971 分标本完成检测。所有患者均检测到 IL-1Ra 基因,有 A₁/A₁、A₁/A₂ 和 A₂/A₂ 3 种基因型,主流人群的基因型为 A₁/A₁,最少见的基因型为 A₂/A₂,未发现少见类型的基因型女性。病情进展组的 A₂ 等位基因的频率明显高于自愈组($P < 0.05$)。在所有患者的阴道灌洗液标本中均能检测到 IL-1 β 和 IL-1Ra 存在。与进展组比较,自愈组的 IL-1 β 水平明显偏低($P < 0.05$)。当

携带 A₂ 等位基因时,进展组 IL-1 β 水平相对偏低,而 IL-1Ra 水平相对升高,无变化组的数值介于进展组和自愈组之间。结论 aBV 患者中的 IL-1Ra 基因多态性特征与阴道分泌物中的 IL-1Ra 含量有关。携带等位基因 A₂ 与 IL-1Ra 含量升高、IL-1 β 含量降低有密切相关性。携带等位基因 A₂ 可能通过与 IL-1Ra 和 IL-1 β 有关的机制影响了 aBV 的临床转归。

关键词 IL-1Ra 基因;基因多态性;无症状细菌性阴道病;IL-1 β ;细菌性阴道病

中图分类号 R 711.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0362-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.029

无症状性细菌性阴道病(asymptomatic bacterial vaginosis, aBV) 是临床最常见的一种阴道微生态失衡状态,其微生态学特征与细菌性阴道病相同^[1-2]。研究^[2]表明,aBV 与多种不良结局密切相关,然而临床治疗面临的最大困境是高复发率,缺乏获得长久疗效的策略。前期研究^[1]的结果提示,应该深入研究影响 aBV 结局的影响因素,探索根据不同特征将 aBV 患者进行分组管理和干预以获得良好临床转归的可能性。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是免疫应答和炎症反应过程中的关键物质^[3]。IL-1

2024-01-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81471420);教育部博士点新教师基金项目(编号:20130001120051)

作者单位:北京大学第一医院妇产科,北京 100034

作者简介:张 瑞,男,博士,主治医师,责任作者,E-mail:zuniverse@163.com

alone and in combination in the diagnosis of primary liver cancer. **Methods** A total of 313 patients were selected, including 78 patients with primary liver cancer, 41 patients with other digestive system tumors, 17 patients with non-digestive system tumors, 20 patients with postoperative liver cancer, and 157 patients with benign liver diseases. The levels of *GNB4* and *Riplet* gene methylation in plasma were detected using quantitative methylation-specific PCR (qMSP). Serum alpha-fetoprotein (AFP) levels were measured by direct chemiluminescence. **Results** The sensitivity and specificity of AFP in diagnosis were 51.3% and 94.3%, respectively; the sensitivity and specificity of *GNB4* gene methylation in diagnosis were 83.3% and 99.4%, respectively; the sensitivity and specificity of *Riplet* gene methylation in diagnosis were 73.1% and 99.4%, respectively. The sensitivity and specificity of *GNB4* and *Riplet* gene methylation combined diagnosis were 92.3% and 98.7%, respectively; the sensitivity and specificity of AFP, *GNB4* and *Riplet* gene methylation combined diagnosis were 92.3% and 98.7%, respectively; the sensitivity and specificity of combined diagnosis including age and gender were 93.6% and 97.5%, respectively. **Conclusion** The sensitivity and specificity of AFP in the diagnosis of primary liver cancer are limited, while the methylation levels of *GNB4* and *Riplet* genes are higher, and the sensitivity and specificity of their combined detection are higher than those of AFP. The sensitivity and specificity of AFP, *GNB4* and *Riplet* gene methylation combined diagnosis are significantly higher than those of AFP, *GNB4* and *Riplet* gene methylation alone.

Key words primary liver cancer; alpha-fetoprotein; gene methylation; *GNB4* gene; *Riplet* gene

受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra)能竞争性地与 IL-1 β 受体结合,从而阻断 IL-1 β 的生物效应,参与局部免疫调控^[4]。IL-1Ra 基因第 2 内含子的多态性导致 IL-1Ra 有 5 个等位基因,其中等位基因 A₂ 与 IL-1 β 的反应迟钝有关,进而影响正常免疫反应^[5]。该研究将探讨等位基因 A₂ 与 aBV 不同结局之间的关系,为探讨分组干预管理、获得良好临床转归提供基础性信息。

1 材料与方法

1.1 病例资料 aBV 患者纳入标准:从 2016 年 9 月至 2019 年 1 月在北京大学第一医院体检中心体检人群中筛选年龄 18~45 岁,无自觉症状且阴道微生态分析 Nugent 评分大于 6 分的育龄期女性。排除标准:① 妊娠、哺乳期;② 4 月内用药者(抗生素、抗真菌药、避孕药等);③ 有其它疾病需要治疗者;④ 妇科检查发现阳性体征者;⑤ 依从性不好;⑥ 下列任何一项影响:衣原体、淋球菌、AV、滴虫和假丝酵母菌。该研究获得北京大学第一医院伦理委员会批准,所有志愿者均自愿签署知情同意书。

1.2 标本收集

1.2.1 阴道灌洗液标本 做妇科检查时,取膀胱截石位,打开窥器,暴露阴道,用 10 ml 无菌生理盐水冲洗阴道壁中段,吸取并收集 5 ml 灌洗液,于 4℃ 离心机 6 500 r/min 离心 5 min,取上清液保存于冰箱(-80℃)备用。

1.2.2 血液标本收集 患者的血样标本均来自其体检血液学检测时的剩余标本。

1.3 临床随访 研究终点为 4 个月,根据症状及微生态学分析,将所有志愿者的结局划分为 3 种:自愈、进展及无明显改变^[1]。

1.4 基因分型检测^[6] IL-1Ra 基因多态性采用 PCR 扩增含有第 2 内含子基因片段的方法来分析。IL-1Ra 第 2 内含子中有 86 bp 重复单元,能扩增出 412、240、498、326、584 bp 的片段,分别代表等位基因 IL-1Ra-1(A₁)、IL-1Ra-2(A₂)、IL-1Ra-3(A₃)、IL-1Ra-4(A₄)、IL-1Ra-5(A₅)。引物序列:正向 5'-CT-CAGCAACACTCCTAT-3',反向 5'-TCCTGGTCTG-CAGGTA-3'。采用 25 μ l 反应体系,含有 PCR Master Mix(Promega)、DNA 模板、正反向引物各 1 ml。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,经 0.1% 溴化乙锭染色后在分析仪上检测 PCR 扩增产物。

1.5 阴道分泌物中 IL-1 β 和 IL-1Ra 浓度的检测 IL-1 β 和 IL-1Ra 的检测采用 ELISA 试剂盒(Abcam,

ab303763, ab211650)检测,操作步骤严格按照说明书进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料用百分比表示,组间比较采用卡方检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本收集情况 该研究共纳入 1 014 例 aBV 患者,其中 984 例完成该研究的所有随访。13 例患者冻存的标本在进行 IL-1Ra 基因多态性、IL-1 β 和 IL-1Ra 检测时没有获得数据结果。共有 971 例患者的检测结果纳入本研究。按照临床转归,971 例患者分为:自愈 40 例,病情进展 430 例,病情无明显变化 501 例。见表 1。

2.2 IL-1Ra 基因多态性 如表 2 所示,本研究中的 971 例 aBV 患者中,检测到的基因型有 A₁/A₁、A₁/A₂ 和 A₂/A₂ 3 种,其中主流人群的基因型在各组均为 A₁/A₁,最少见的基因型均为 A₂/A₂,未发现少见类型的基因型女性。2 个等位基因在 3 种结局的人群中表现频率存在一定差异。其自愈组 A₂ 等位基因的阳性频率最低,与进展组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),与无变化组比较,差异无统计学意义。

表 1 基线资料

项目	自愈	进展	无明显变化
年龄(岁)	18~42	20~46	18~40
BMI(kg/m ²)	15~31	18~29	16~26
有阴道冲洗习惯[n(%)]	26(31.3)	30(36.1)	27(32.5)
长期使用安全套[n(%)]	38(38.0)	30(30.0)	32(32.0)
BV 病史[n(%)]	15(32.6)	19(41.3)	12(26.1)
经常出差[n(%)]	24(27.0)	33(37.1)	32(36.0)

2.3 阴道分泌物中 IL-1 β 和 IL-1Ra 的含量 所有标本中均能检测到 IL-1 β 和 IL-1Ra,其中自愈组的 IL-1 β 水平高于进展组(*P* < 0.05),而自愈组的 IL-1Ra 水平低于进展组(*P* < 0.05)。在等位基因 A₂ 携带时,IL-1Ra 的水平较等位基因不携带时更高,但是差异无统计学意义(表 3)。

3 讨论

aBV 是临床工作中非常常见的一种女性生殖系统异常状态,其微生态学特征与细菌性阴道病一样,但是缺乏临床症状。研究^[7-8]表明,aBV 患者更易

表2 各组 IL-1Ra 基因型及等位基因频率分布[$n(\%)$]

组别	n	基因型				等位基因	
		A ₁ /A ₁	A ₁ /A ₂	A ₂ /A ₂	少见类型	A ₁	A ₂
自愈	40	35(87.5)	4(10.0)	1(2.5)	0(0.0)	74(92.5)	6(7.5)
进展	430	294(68.4)	87(20.2)	49(11.4)	0(0.0)	675(78.5)	185(21.5)*
无明显变化	501	398(79.4)	82(16.4)	21(4.2)	0(0.0)	878(87.6)	124(12.4)

与自愈组比较: * $P < 0.05$

表3 IL-1 β 和 IL-1Ra 在各组的含量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	无 A ₂ 携带者		A ₂ 携带者	
		IL-1 β (pg/ml)	IL-1Ra(ng/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-1Ra(ng/ml)
自愈	40	49.9 \pm 4.01*	19.6 \pm 1.58*	40.5 \pm 1.29	30.2 \pm 1.25
进展	430	20.4 \pm 5.61	109.6 \pm 2.68	9.9 \pm 2.72	150.5 \pm 2.43
无明显变化	501	30.1 \pm 3.81	39.5 \pm 2.31	15.2 \pm 1.03	60.2 \pm 1.26

与进展组比较: * $P < 0.05$

被人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)持续感染,而高危型 HPV 持续感染是导致宫颈癌发生的最主要因素。aBV 与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、淋球菌、衣原体和滴虫感染明显相关。另外, aBV 能导致盆腔炎、不孕、流产、早产、胎膜早破及多种不良结局,严重影响母婴健康^[9]。由于 aBV 具有隐蔽性,其巨大的危害常常被大家忽略。aBV 患者无自觉症状,很难被发现和确诊。随着社会的发展、人民生活水平的提高,逐步推广的健康体检,让越来越多的 aBV 患者被发现和诊断。根据课题组前期的研究^[1]结果,如何将 aBV 患者人群按照一定的特征进行分类之后,再实施不同的管理和干预策略,可能是一个有意义的探索方向。

IL-1 β 是一个主要的前炎症因子,能诱导许多细胞因子(IL-6、IL-8、TNF- α)的合成,参与免疫反应过程^[10]。IL-1Ra 是个天然的 IL-1 β 效应抑制剂,能够通过一定的机制抑制 IL-1 β 的反应,调控 IL-1 β 介导的免疫反应,多数情况下,IL-1Ra 抑制了 IL-1 β 产生的过渡免疫反应,保护正常的组织结构免受免疫反应的破坏^[10]。研究^[3,10]表明,革兰阴性短杆菌和阴道加德纳菌能刺激 IL-1 β 和 IL-1Ra 基因的表达。阴道菌群异常和细菌性阴道病时,IL-1 β 和 IL-1Ra 均会不同程度升高^[11]。IL-1Ra 的编码基因第 2 内含子存在多态性,有 5 种不同重复组合等位基因(包括 IL-1RaA₁、IL-1RaA₂、IL-1RaA₃、IL-1RaA₄ 和 IL-1RaA₅),各等位基因在不同人群中的分布存在差别。在中国人群中 IL-1RaA₁ 发生频率最高,IL-1RaA₂ 次之,其它类型及其少见^[12]。不同的基因型对阴道菌群的反应、对 IL-1 β 的调控效力可能存在

差别^[13]。该研究首次探讨了 IL-1Ra 基因第 2 内含子多态性与 aBV 患者自然结局的关系。结果显示, aBV 患者中, A₁/A₁ 是主流的基因型,占据人群的 68.5% ~ 87.5%,而 A₂/A₂ 基因型比例最低,仅占人群的 2.5% ~ 11.4%。其中等位基因 A₁ 的比例 78.5% ~ 92.5%,而等位基因 A₂ 的比例 7.5% ~ 21.5%。这与中国人群中基因多态性的分布特征一致^[14]。最重要的是 A₂ 等位基因的比例在自愈组和病情进展组存在显著差异,这提示 A₂ 等位基因可能是导致 aBV 患者出现不同结局的重要因素之一。

IL-1Ra 的水平从一定程度上反应了 IL-1Ra 基因表达的情况。本研究显示 IL-1 β 和 IL-1Ra 水平在自愈组和进展组均存在显著差异,这提示这两个因子可能与 aBV 的结局存在相关性。在自愈组和进展组,IL-1 β 和 IL-1Ra 呈反向相关,这提示了 IL-1Ra 对 IL-1 β 可能存在负性调控。而当 A₂ 等位基因存在时,IL-1Ra 的水平没有发生明显变化时,IL-1 β 的水平在两组间也有明显差异,这提示除了 IL-1Ra 能够调控 IL-1 β 之外,可能存在其它机制也参与了 IL-1 β 的调控。

参考文献

- [1] Zhang R, Liu Z, Zhang Y, et al. Natural progress history of asymptomatic bacterial vaginosis in Chinese Han women and associated risk factors[J]. Postgrad Med, 2022, 134(7): 659-67.
- [2] Muzny C A, Schwebke J R. Asymptomatic bacterial vaginosis: to treat or not to treat? [J]. Curr Infect Dis Rep, 2020, 22(12): 32.
- [3] Gene M R, Vardhana S, Delaney M L, et al. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004, 116(2): 152-

- 6.
- [4] Arend W P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family[J]. *J Clin Invest*, 1991, 88(5): 1445 - 51.
- [5] Jiang J, Zhang X, Sun D, et al. Study on VNTR polymorphism of gene IL-1RA in 19 Chinese populations[J]. *Int J Immunogenet*, 2010, 37(2): 73 - 7.
- [6] 段海燕, 章锦才, 黄萍, 等. 四种方法获取 DNA 用于检测 IL-1 基因多态性的比较分析[J]. *华西口腔医学杂志*, 2001(01): 11 - 3.
- [7] Kero K, Rautava J, Syrjänen K, et al. Association of asymptomatic bacterial vaginosis with persistence of female genital human papillomavirus infection[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36(11): 2215 - 9.
- [8] Abdool K S, Baxter C, Passmore J S, et al. The genital tract and rectal microbiomes; their role in HIV susceptibility and prevention in women[J]. *J Int AIDS Soc*, 2019, 22(5): e25300.
- [9] Olusola P, Banerjee H N, Philley J V, et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities[J]. *Cells*, 2019, 8(6): 622.
- [10] Gene M R, Witkin S S, Delaney M L, et al. A disproportionate increase in IL-1 β over IL-1ra in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(5): 1191 - 7.
- [11] Mahmoudi A L, Karaman E, Beyaz B, et al. Expression and characterization of recombinant IL-1Ra in *Aspergillus oryzae* as a system[J]. *BMC Biotechnol*, 2023, 23(1): 15.
- [12] 蒋萍. 白介素-1 基因与中国人散发性帕金森病的关系[J]. *实用预防医学*, 2010, 17(4): 669 - 71, 628.
- [13] Gene M R, Onderdonk A B, Vardhana S, et al. Polymorphism in intron 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene, local midtrimester cytokine response to vaginal flora, and subsequent preterm birth[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 191(4): 1324 - 30.
- [14] 刘兴, 冯凯, 蒋建新, 等. 中国重庆地区汉族群体白介素-1 受体拮抗剂基因多态性分布的初步观察[J]. *第三军医大学学报*, 2002, 24(2): 200 - 1.

Relationship between IL-1Ra gene polymorphism and the natural outcome of asymptomatic bacterial vaginosis

Zhang Rui, Gao Jiahuizi, Dong Hanyu, Li Chang, Yin Haixu

(Dept of Obstetrics & Gynecology, Peking University First Hospital, Beijing 100034)

Abstract Objective To investigate the relationship between interleukin 1 receptor a(IL-1Ra) gene polymorphism and different outcomes in asymptomatic bacterial vaginosis (aBV) patients with the aim of grouping and managing aBV patients. **Methods** In study on the natural attribution of aBV patients, all patients were enrolled and a sample of venous blood and vaginal lavage fluid were separately frozen. After 4 months at the end of the clinical study, patients who completed the study were divided into three groups based on clinical outcomes: self-healing, progressive, and unchanged. The IL-1Ra gene polymorphism, the concentration of IL-1 β and IL-1Ra were tested, and the differences in the above indicators among three groups of patients with different outcomes were compared. **Results** 1 014 Chinese Han female patients were enrolled, and 984 patients completed clinical follow-up and obtained clinical outcome data. 13 specimens were unusable during testing, with a total of 971 specimens completed the test. IL-1Ra gene was detected in all patients, with three genotypes: A_1/A_1 , A_1/A_2 , and A_2/A_2 . Most population had a genotype of A_1/A_1 , with the rarest genotype being A_2/A_2 . No rare genotype of female was found. The frequency of A_2 alleles in the progression group was significantly higher than that in the self-healing group ($P < 0.05$). IL-1 β and IL-1Ra were detected in all vaginal lavage fluid samples. Compared with the progression group, IL-1 β in the self-healing group was significantly lower ($P < 0.05$). When carrying the A_2 allele, IL-1 β in progression group was relatively low, while the level of IL-1Ra was relatively high. The values of the unchanged group were middle. **Conclusion** The polymorphism characteristics of the IL-1Ra gene in aBV patients are related to the IL-1Ra content in vaginal secretions. Carrying allele A_2 is related to the elevation of IL-1Ra, the decrease of IL-1 β in vaginal secretions. Carrying allele A_2 may affect the clinical outcome of aBV by some potential mechanism.

Key words IL-1Ra gene; genetic polymorphism; asymptomatic bacterial vaginosis; IL-1 β ; bacterial vaginosis