

# IL-17A 基因-197A/G 位点顺式调控机制 及其对 IL-17 表达的影响

李继荣,王志坚,陶保菊

(南部战区海军第二医院感染科,海南 三亚 572000)

**摘要:**目的 探讨 IL-17A 基因-197A/G 位点顺式调控作用及其对 IL-17 表达的影响。方法 采用 TaqMan 系统对我院血液中心 2021 年 2 月 1 日-6 月 1 日 406 名健康献血员全血样本进行 IL-17A 基因-197A/G 位点基因分型,采用酶联免疫吸附试剂盒测定不同基因型个体血清 IL-17 水平,另通过电泳迁移率实验观察 IL-17A 基因-197A/G 位点顺式调控作用。结果 不同性别基因型分布及等位频率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );不同基因型个体间 IL-17 水平比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中 IL-17 水平随基因型由 AA[(296.12±63.43)pg/ml]→AG[(262.43±56.14)pg/ml]→GG[(159.17±31.46)pg/ml]变化呈递减趋势;电泳迁移率实验显示,一未知核因子与 IL-17A 基因-197A/G 位点(rs2275913)A 等位及 G 等位 DNA 探针特异性结合,但亲和力差异显著(A 等位>G 等位)。结论 IL-17A 基因-197A/G 位点是一个非常关键的功能位点,通过特异性与一未知核转录因子结合而发挥对 IL-17 表达的顺式调控作用。

**关键词:**单核苷酸多态性;基因调控;顺式调控

中图分类号:Q344+.14

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.01.018

文章编号:1006-1959(2023)01-0095-04

## The Cis-regulatory Mechanism of IL-17A Gene-197A/G Site and its Effect on IL-17 Expression

LI Ji-rong,WANG Zhi-jian,TAO Bao-ju

(Department of Infectious Diseases,the Second Naval Hospital,Southern Theater Command,Sanya 572000,Hainan,China)

**Abstract: Objective** To investigate the cis-regulation mechanism of IL-17A gene-197A/G site and its effect on IL-17 expression.**Methods** The TaqMan system was used to genotype the IL-17A gene-197A / G locus in the whole blood samples of 406 healthy blood donors in the blood center of our hospital from February 1 to June 1,2021. The serum IL-17 levels of individuals with different genotypes were determined by enzyme-linked immunosorbent assay kit. In addition, the cis-regulation of IL-17A gene-197A/G locus was observed by electrophoretic mobility assay.**Results** There was no significant difference in genotype distribution and allele frequency between different genders ( $P>0.05$ ). There were significant differences in IL-17 levels among different genotypes ( $P<0.05$ ), while the level of IL-17 decreased with the change of genotype from AA [(296.12±63.43) pg/ml]→AG [(262.43±56.14)pg/ml]→GG [(159.17±31.46)pg/ml]. Electrophoretic mobility shift assay showed that an unknown nuclear factor could specifically bind to A and G allelic DNA probes of IL-17A gene-197A/G site (rs2275913), but the affinity was significantly different (A allelic>G allelic).**Conclusion** The IL-17A gene-197A/G site is a very critical functional site, which plays a cis-regulatory role in IL-17 expression by specifically binding to an unknown nuclear transcription factor.

**Key words:**Single nucleotide polymorphism;Gene regulation;Cis-regulation

白介素是一组由多种类型细胞所分泌的、结构和功能各异的可溶性蛋白,这些蛋白主要用于不同细胞间的信息交换,在炎症反应的发生、发展中发挥了不可忽视的作用。IL-17A 家族由 6 个同源的细胞因子 IL-17A 到 IL-17F 组成,分别与相应的受体偶联并引发的炎症产生。IL-17 主要由活化的 T helper-17(Th-17)细胞、双阴性(DN)T 细胞、巨噬细胞和中性粒细胞分泌。在已知的 6 个成员中,IL-17A 和 IL-17F 尤为重要,其在炎症细胞的招募、上调趋化因子表达和促进 T 细胞向组织迁移中具有关键

的生物学作用,直接或间接介导了多种自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化症、肿瘤、牙体牙周病等。目前对 IL-17A 基因相关的研究大多聚焦在 IL-17A 基因启动子区几个重要的单核苷酸多态性(SNPs)位点,其中 IL-17A 基因 rs2275913(-197A/G)和 IL-17F 基因 rs763780(7488T/C)位点显得尤为重要。但对于 IL-17A 基因启动子区这些重要的 SNPs 位点的顺式调控机制及其对 IL-17 表达的影响报道较少。本研究通过 IL-17A 基因启动子区-197A/G 位点区域基因信息学检索,通过 EMSA 实验观察-197A/G 位点顺式调控作用,对 406 名健康献血员全血样本进行-197A/G 位点基因分型并检测其不同基因型个体的 IL-17 水平,初步探讨 IL-17A 基因-197A/G 位点顺式调控机制及

其对 IL-17 表达的影响,现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南部战区海军第二医院血液中心 2021 年 2 月 1 日~6 月 1 日 406 名健康献血员全血样本,其中男 206 例,女 200 例;年龄 25~48 岁,平均年龄(36.00±7.52)岁。本研究经南部战区海军第二医院伦理委员会授权,并征求受试者知情同意,签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 酶联免疫吸附试剂盒(默沙克);DNA 抽提试剂盒 Wizard Genomic DNA Purification Kit;PCR 试剂盒 GoTaq Green Master (Promega);EMSA Kit、蛋白酶抑制剂(Pierce);1640 培养液及胎牛血清(Gibco);电泳迁移率实验中所有生物素标记 DNA 探针及冷竞争探针(Beyotime Biotechnology);TaqMan 探针试剂盒(Life Technologies Corporation)。

### 1.3 方法

1.3.1 IL-17 基因-197A/G 位点区域的生物信息学分析 为鉴定与其结合的相关核转录因子,登录 TF-BIND 门户网站(<http://tfbind.hgc.jp/>),在线对 IL-17 基因-197 位点 A/G 等位探针序列进行同源性分析检索,筛选出序列同源性较高的转录因子 GATA、CAP。

1.3.2 细胞培养、核蛋白抽提 THP-1 细胞培养基包含 RPMI1640、10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素-链霉素、2.05 mmol/L 谷氨酰胺。培养箱 CO<sub>2</sub> 浓度设定 5%,温度 37 ℃<sup>[1]</sup>。核蛋白抽提:收集细胞悬液,4 ℃ 500×g 离心 10 min 去上清,PBS 漂洗后重悬,细胞计数。用 1 ml 冷 PBS 将细胞重悬于 1.5 ml EP 管,加入 400 μl 冷缓冲液 A,振荡混匀。置冰上 10 min,振荡 10 s,离心后弃上清,加入 30 μl 冷缓冲液 C,冰孵 20 min,离心后收集上清并于-70 ℃保存<sup>[2]</sup>。

1.3.3 基因组 DNA 抽提 取 1.5 ml EP 管加入 300 μl 全血,加入裂解液 900 μl 后混匀,室温下孵育 10 min。离心弃上清后,重悬白细胞,加核裂解液 300 μl,混匀后加蛋白沉淀液 100 μl,混匀后离心 3 min,转移上清至另一 1.5 ml 离心管,加入 300 μl 异丙醇,混匀直至出现肉眼可见线状 DNA。离心后弃上清,以 70%乙醇 300 μl 漂洗后离心去乙醇,自然干燥后加入 100 μl DNA 水化液,置 4 ℃孵箱过夜再水化,2 ℃~8 ℃保存备用<sup>[3]</sup>。

1.3.4 IL-17A 基因-197A/G 位点多态性测定 应用 TaqMan 系统进行基因多态性测定,探针序列(A:VIC -TGCCCTTCCCATTTCCTTCAGAAG, A-GAGATTCTTCTATGACCTCATTGG -MAGBNFQ;G:

FAM -TGCCCTTCCCATTTCCTTCAGAAG,AGA-GATTCTTCTATGACCTCATTGG-MAGBNFQ),采用 7500 型 realtime PCR 仪(ABI)进行抽提 DNA 扩增,PCR 扩增反应条件:95 ℃变性处理 10 min,92 ℃退火处理 1 min,60 ℃延伸 1 min,40 个循环<sup>[4]</sup>。

1.3.5 血清 IL-17 水平检测 采集献血员外周静脉血,取 2 ml 进行离心处理后获得上清液,采用酶联免疫吸附试剂盒测定 IL-17 水平。

1.3.6 EMSA(电泳迁移率检测)实验 采用 25 μl 反应体系,将生物素标记双链寡核苷酸探针 IL-17A 基因-197AA/GG[5'-TTTCCTTCAGAAG(A/G)AGA-GATTCTTCTA-3'及互补链]各 1 μl 与 THP-1 细胞核蛋白 5 μl 室温孵育 20 min 上样,以 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 90 min (0.5%TBE,100 V 先预电泳 1 h),湿法转膜 1 h(0.5%TBE,380 mA),将尼龙膜以 254 nm 波长紫外光交联 10 min,以 15 ml Block-ing Buffer 封闭 15 min,以 Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate 偶联 15 min,再用 Wash Buffer 漂洗后加入 20 ml Substrate Equilibration Buffer 置于定轨摇床上平衡 5 min,加入 1:1 Luminol/Enhancer Solution 10 ml 将膜浸泡 5 min 后在凝胶成像仪下曝光显影<sup>[5]</sup>。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验;计数资料以[n(%)]表示,采用  $\chi^2$  检验。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 IL-17A-197A/G 位点基因型分布及等位频率 不同性别基因型分布及等位频率比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

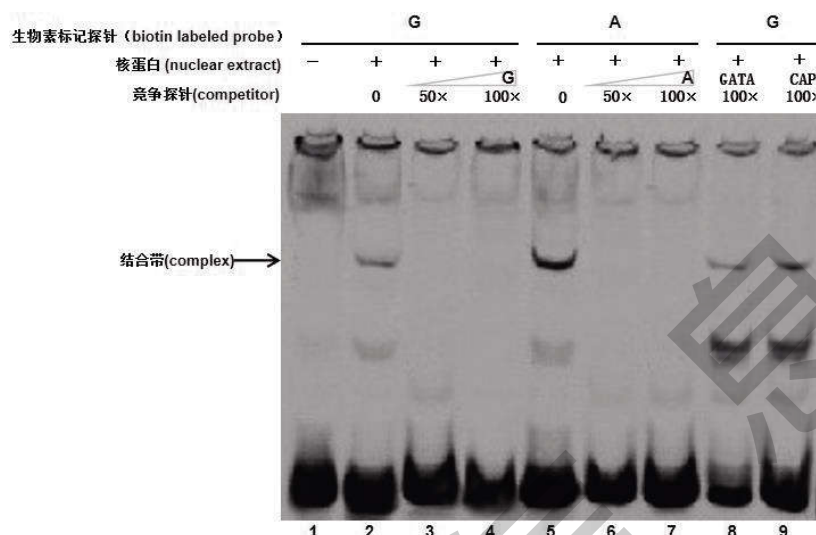
表 1 不同性别基因型分布及频率比较(*n*,%)

基因型		男性( <i>n</i> =206)		女性( <i>n</i> =200)	
		<i>n</i>	占比	<i>n</i>	占比
基因型分布	AA	46	22.33	47	23.50
	AG	47	22.82	55	27.50
	GG	113	54.85	98	49.00
基因型等位频率	A	139	33.74	149	37.25
	G	273	66.26	251	62.75

2.2 不同基因型个体血清 IL-17 水平比较 不同基因型个体间 IL-17 水平比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),其中 IL-17 水平随基因型由 AA[(296.12±63.43)pg/ml]→AG [(262.43±56.14)pg/ml]→GG [(159.17±31.46)pg/ml]变化呈递减趋势。

2.3 EMSA 实验结果 电泳迁移率检测实验显示,2、5、8、9 泳道可见结合条带,且泳道 5 比泳道 2 条带强度明显要高,说明未知核因子与-197A 等位探针的亲合力大于-197G 等位。3、4、6、7 泳道进行了-197G、-197A 等位探针的竞争稀释实验,被竞争抑

制后未知结合条带消失,提示未知核因子与-197G/A 等位探针结合的特异性。8、9 泳道中尝试以候选因子 GATA、CAP 冷探针对 A 等位生物素标记 DNA 探针进行竞争抑制,但未知结合条带未消失,提示该转录因子非 GATA 和 CAP。



注:1:未加核蛋白空白对照;2:G 等位结合反应;3、4:G 等位冷竞争稀释实验;5:A 等位结合反应;6、7:A 等位冷竞争稀释实验;8:GATA 冷探针对 G 等位探针竞争稀释实验;9:CAP 冷探针对 G 等位探针竞争稀释实验

图 1 IL-17A -197A/G 位点顺式调控作用 EMSA 分析结果

### 3 讨论

炎症反应是机体抵御异源有害物质时产生的一种保护反应。当机体遭遇病原微生物、过敏原、化学物质刺激或组织损伤时,这种保护反应就会发生,从而导致局部或全身的红、肿、热、痛及功能障碍。一般来说,这些症状对于机体是有益的,而这些不适反应主要来源于炎症局部大量炎症因子的释放以及淋巴细胞的浸润,当异源物质被清除后,这些反应就会慢慢消失。人体是个复杂的生态系统,炎性反应对于维持人体的稳态具有至关重要的作用。除此之外,炎症也可以引起人体免疫系统功能紊乱,当异物入侵,抗原提呈后机体的免疫系统不能正常识别或者反应过激一样可导致自身免疫损伤,引发相应的炎症反应。而持续的炎症反应又会导致诸多代谢性疾病,如肿瘤、风湿关节病肥胖、糖尿病、哮喘以及心血管等疾病,并极大程度增加一些相关疾病的易感性。

IL-17 由 Th17 细胞分泌产生,是 Th17 细胞主要效应因子<sup>[6-8]</sup>。IL-17 可以促进 T 细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子,如 IL-6、IL-8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和化学增活素及细胞黏附分子 1 (cellular ad-

hesion molecule 1, CAM-1),从而导致炎症的产生<sup>[9-11]</sup>。IL-17 的编码基因位于人染色体 6P12,基因全长 4252 bp,SNP 位点众多,其中 IL-17A 的 G-197A (rs2275913)和 IL-17F 的 7488T/C (rs763780)这两个启动子区的 SNP 位点报道较多<sup>[12-14]</sup>。Liu XK 等<sup>[15]</sup>研究认为,IL-17A 基因的 G-197A 位点处于启动子区的核因子活跃区,可调控 IL-17 表达。与-197G 等位相比,-197A 等位启动子活性更高。Espinoza JL 等<sup>[16]</sup>研究发现,携带-197A 等位基因型 PBMCI-17 表达量更高。

本研究发现,IL-17A 基因-197A/G 等位探针均能与未知核因子特异性结合产生结合条带,且未知核因子与-197A 等位探针的亲合力大于-197G 等位。竞争稀释后未知结合条带消失,证明了未知核因子与-197G/A 等位的结合具有特异性。本研究尝试以候选因子 GATA、CAP 冷探针对-197A 等位生物素标记 DNA 探针进行竞争抑制,但未知结合条带未消失,提示该转录因子非 GATA 和 CAP。为进一步探讨 IL-17A 基因 G-197A 位点对 IL-17 表达的影响,本研究采用酶联免疫吸附试剂盒测定不同基因型个体 IL-17 水平,发现携带 A 等位基因个体其

IL-17 检测水平高于携带 G 等位基因个体,IL-17 水平随基因型由 AA→AG→GG 变化呈递减趋势,提示 IL-17A 基因 G-197A 位点发挥了重要的顺式调控作用,直接影响 IL-17 表达水平。IL-17 过量表达容易导致相关疾病产生。研究表明<sup>[17-20]</sup>,IL-17 与自身免疫性脑炎、哮喘、类风湿性关节炎、牙周炎、病毒性肝炎、溃疡性结肠炎等自身免疫性疾病明显相关。本研究结果表明,IL-17A 基因 197A 等位导致 IL-17 表达增加,而 IL-17 是 Th17 细胞主要效应因子,作为重要的致炎因子导致诸多感染性、自身免疫性疾病的发生<sup>[21,22]</sup>。

综上所述,IL-17A 基因 G-197A/G 位点是一个重要的转录调控位点,通过特异性与一未知核转录因子结合而发挥对 IL-17 表达的顺式调控作用。

#### 参考文献:

- [1]Rønning SB,Voldvik V,Bergum SK,et al.Ellagic acid and urolithin A modulate the immune response in LPS-stimulated U937 monocytic cells and THP-1 differentiated macrophages [J].Food Funct,2020,11(9):7946-7959.
- [2]Li J,Li J,Chen S.The role of upstream stimulatory factor 1 in the transcriptional regulation of the human TBX21 promoter mediated by the T-1514C polymorphism associated with systemic lupus erythematosus [J].Immunogenetics,2012,64 (5):361-370.
- [3]Li JR,Li JG,Deng GH,et al.A common promoter variant of TBX21 is associated with allele specific binding to Yin-Yang 1 and reduced gene expression [J].Scand J Immunol,2011,73 (5):449-458.
- [4]黎增辉,李金强,谢雅,等.IL-17 基因多态性与 HBV 感染致肝硬化病情和临床转归的关系 [J].中华医院感染学杂志,2021,31(11):1607-1611.
- [5]Gong W,Li J,Chen W,et al.Resveratrol Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Extracellular Matrix Accumulation and Inflammation in Rat Glomerular Mesangial Cells by SphK1/S1P2/NF-κB Pathway [J].Diabetes Metab Syndr Obes,2020,20(13):4495-4505.
- [6]Yasuda K,Takeuchi Y,Hirota K.The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J].Semin Immunopathol,2019,41(3):283-297.
- [7]Beurel E,Lowell JA.Th17 cells in depression [J].Brain Behav Immun,2018,5(69):28-34.
- [8]Lee JY,Hall JA,Kroehling L,et al.Serum Amyloid A Proteins Induce Pathogenic Th17 Cells and Promote Inflammatory Disease[J].Cell,2020,180(1):79-91.
- [9]He W,Zhu H,Liu C.Profiles of inflammation factors and inflammatory pathways around the peri-miniscrew implant[J].Histol Histopathol,2021,36(9):899-906.
- [10]Östling J,van Geest M,Schofield JPR,et al.IL-17-high asthma with features of a psoriasis immunophenotype[J].J Allergy Clin Immunol,2019,144(5):1198-1213.
- [11]Ghaznavi H,Soltanpour MS.Association study between rs2275913 genetic polymorphism and serum levels of IL-17A with risk of coronary artery disease [J].Mol Biol Res Commun,2020,9(1):35-40.
- [12]Mohammadi FS,Aslani S,Mostafaei S,et al.Are genetic variations in IL-21-IL-23R-IL-17A cytokine axis involved in a pathogenic pathway of rheumatoid arthritis? Bayesian hierarchical meta-analysis[J].J Cell Physiol,2019,234(10):17159-17171.
- [13]Jiang H,An L.Lack of Evidence for an Association between IL-17F Rs763780 Polymorphism and Pulmonary Tuberculosis [J].Immunol Invest,2021,50(6):726-734.
- [14]Ghaznavi H,Soltanpour MS.Association study between rs2275913 genetic polymorphism and serum levels of IL-17A with risk of coronary artery disease [J].Mol Biol Res Commun,2020,9(1):35-40.
- [15]Liu XK,Lin X,Gaffen SL.crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human-interleukin-17[J].Biolchem,2020,279(50):52762-52771.
- [16]Espinoza JL,Takami A,Onizuka M,et al.A single nucleotide polymorphism of IL-17 gene in the recipient is associated with acute GVHD after HLA-matched unrelated BMT [J].Bone Marrow Transplant,2011,46(11):1455-1463.
- [17]Singh I,Nath N,Saxena N,et al.Regulation of IL-10 and IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis by S-nitrosoglutathione[J].Immunobiology,2018,223(10):549-554.
- [18]Ramakrishnan RK,Al Heialy S,Hamid Q.Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic [J].Expert Rev Respir Med,2019,13(11):1057-1068.
- [19]Noack M,Miossec P.Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis[J].Semin Immunopathol,2017,39(4):365-383.
- [20]Bunte K,Beikler T.Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases[J].Int J Mol Sci,2019,20(14):3394.
- [21]Jie Z,Liang Y,Yi P,et al.Retinoic Acid Regulates Immune Responses by Promoting IL-22 and Modulating S100 Proteins in Viral Hepatitis[J].J Immunol,2017,198(9):3448-3460.
- [22]Smillie CS,Biton M,Ordovas-Montanes J,et al.Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis[J].Cell,2019,178(3):714-730.

收稿日期:2022-05-02;修回日期:2022-05-21

编辑/杜帆