

# 四川地区汉族单纯性泛发性脓疱型银屑病患者 *IL36RN* 基因多态性研究\*

李仲桃, 汪盛<sup>△</sup>

四川大学华西医院 皮肤性病科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 检测四川地区汉族单纯性泛发性脓疱型银屑病(GPP)患者白介素-36受体拮抗剂基因(*IL36RN*)的多态性,初步明确该地区单纯性GPP患者的发病机制。方法 提取GPP患者、寻常型银屑病(PV)患者和正常对照人群的基因组DNA,采用PCR方法扩增各组人群*IL36RN*目的基因片段,电泳鉴定后进行基因测序,分析*IL36RN*基因多态性在不同人群中的分布差异,同时比较儿童期发病的GPP(PGPP)及成人期发病的GPP(AGPP)患者*IL36RN*的变异频率。结果 在四川地区汉族单纯性GPP患者中发现3个*IL36RN*基因变异位点(c.115+6T>C、c.140A>G、c.227C>T),其中c.115+6T>C变异最常见。单纯性GPP患者的*IL36RN*基因变异频率与PV组、正常对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),但PGPP组与AGPP组*IL36RN*基因变异频率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 *IL36RN*基因可能是四川地区汉族单纯性GPP患者最常见的致病基因,c.115+6T>C是一突变热点。单纯性GPP的*IL36RN*变异频率可能与发病年龄无关。

**【关键词】** 脓疱型银屑病 *IL36RN* 变异

**Genetic Polymorphism of *IL36RN* in Han Patients with Generalized Pustular Psoriasis Alone in Sichuan Region** LI Zhong-tao, WANG Sheng<sup>△</sup>. Department of Dermatology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: wangsheng1892@sina.com

**【Abstract】 Objective** To detect interleukin-36-receptor antagonist gene (*IL36RN*) in Han patients with generalized pustular psoriasis (GPP) alone in Sichuan region for the purpose of clarification of GPP pathogenesis. **Methods** Genomic DNA of GPP patients, psoriasis vulgaris (PV) patients and normal controls was extracted and subjected to PCR for the amplification of entire encoding and splice sites of *IL36RN* gene followed by bidirectional sequencing. Differences in frequencies of *IL36RN* variants between three groups were analyzed. The variant frequency between pediatric-onset GPP (PGPP) and adult-onset GPP (AGPP) was also compared. **Results** Three *IL36RN* variants (c.115+6T>C, c.140A>G, c.227C>T) were found in Han GPP patients from Sichuan. Among them, c.115+6T>C had the highest frequency. Compared with PV patients and normal controls, all the variants frequency had statistical significance ( $P<0.05$ ). There was no significant difference of variants frequency of *IL36RN* between PGPP and AGPP group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** *IL36RN* may be the most common disease-causing gene in the patients with GPP alone in Han population from Sichuan region.

**【Key words】** Pustular psoriasis *IL36RN* Variant

泛发性脓疱型银屑病(GPP)临床以突发泛发性红斑与无菌性脓疱伴寒颤、高热、嗜中性粒细胞增高及C反应蛋白增高为特征,治疗困难,容易复发,严重者可影响患者的生活质量甚至危及生命<sup>[1-2]</sup>。通常认为GPP是银屑病的一种亚型,但在临床表现、组织病理等各方面,它与其他各型银屑病均有较大差异。近年来的研究发现,在发病机制方面GPP也具有明显的特殊性。寻常型银屑病(PV)和关节病型银屑病(PsA)的遗传易感性与人类白细胞抗原

(HLA)基因密切相关<sup>[3-4]</sup>,但自2011年MARRAKCHI等<sup>[5]</sup>首次报道GPP患者携带白介素-36受体拮抗剂基因(*IL36RN*)突变以来,越来越多的研究表明,*IL36RN*突变很可能是单纯性GPP的主要分子遗传基础。少数研究还发现儿童期发病的GPP(PGPP)比成人期发病的GPP(AGPP)具有更高的*IL36RN*突变发生频率,因此推测遗传因素在儿童型GPP中发挥更为重要的作用<sup>[6]</sup>。

目前,国内少有GPP患者*IL36RN*基因多态性研究的报道。本研究通过检测*IL36RN*基因在四川地区汉族单纯性GPP患者的变异情况,比较PGPP及AGPP患者*IL36RN*的变异频率,初步明

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2014SZ0234)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: wangsheng1892@sina.com

确该地区单纯性 GPP 患者的发病机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

根据病史、临床表现及皮损病理组织学表现,纳入 2012 年 1 月 1 日至 2016 年 1 月 1 日于四川大学华西医院诊断为单纯性 GPP 的患者 24 例(平均年龄 34.17 岁,男性 12 例,女性 12 例),患者全部为四川地区汉族。根据发病年龄将 <18 岁者归为 PGPP 组(12 例), $\geq 18$  岁者归为 AGPP 组(12 例)。PGPP 组中男性 7 例,女性 5 例(男:女=1.4),发病年龄 0~13 岁(平均 7.58 岁);AGPP 组中男性 5 例,女性 7 例(男:女=0.71),发病年龄 20~66 岁(平均 41.08 岁)。以 50 例 PV 患者(平均年龄 38.26 岁,男性 25 例,女性 25 例)及 50 例健康人(平均年龄 32.65 岁,男性 25 例,女性 25 例)作为对照组,均为四川地区汉族。本研究获四川大学华西

医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 外周血基因组 DNA 提取** 研究对象签署知情同意书后(<18 岁者同时征得监护人同意),采集研究对象外周血各 2.5 mL,2% 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,-20 °C 冷冻保存。用试剂盒 [TIANamp Genomic DNA kit, TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD. Cat # DP304-02] 提取基因组 DNA,具体方法参照说明书。取适量 DNA 原液用紫外分光光度计进行定量和纯度检测,其余放 -20 °C 保存备用。

**1.2.2 引物的设计与合成** 通过美国国家生物信息中心(NCBI)基因库检索到 *IL36RN* 基因(NM\_173170)序列,应用 Premier Primer 5 软件设计引物扩增包括编码序列与剪切位点序列。引物由上海生物工程技术有限公司合成(表 1)。

**1.2.3 PCR 扩增** PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L,含 10

表 1 *IL36RN* 基因 PCR 扩增引物  
Table 1 Primers for amplifying *IL36RN*

Amplified region	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature/°C	Product size/bp
Exon2	F: GGTGGTACCGGAGCTCTCTC	57	345
	R: GTAAAACGACGGCCAGTTGAGGTGCTGGTCACAATTTTC		
Exon3	F: ATCCTCCTTGATAGGGCATGAG	57	410
	R: GTAAAACGACGGCCAGTTTGTCTTAGAGCCTGGTTTGTG		
Exon4	F: GTAAAACGACGGCCAGTCAGGCCGCTTACAGCAGTC	57	362
	R: ATCCTTAGGGAGGAGGCAAAG		
Exon5	F: GTAAAACGACGGCCAGTCAGCTTTGCCTCCTCCCTAAG	57	438
	R: AGGTGCCCACTAAGTCAGACG		

倍缓冲液 2.5  $\mu$ L、dNTP 0.8 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L、引物各 0.5  $\mu$ mol/L、模板 DNA 0.2  $\mu$ g、*Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min 后,94 °C 变性 30 s,57 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 40 s,共 35 个循环。72 °C 后延伸 5 min。PCR 产物 4 °C 保存,取 5  $\mu$ L PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

**1.2.4 PCR 产物测序分析** PCR 产物纯化后,采用 ABI PRISM 3730XL 自动测序仪直接双向测序。测序由北京擎科生物技术有限公司完成。利用 Sequencer 4.10.1 Demo 软件与基因组序列进行比对分析,查找有无突变。

**1.2.5 统计学方法** *IL36RN* 基因突变频率的组间比较采用 2 $\times$ 2 四格表卡方检验。当  $n < 40$  ( $n$  为总例数)或  $T < 1$  ( $T$  为理论频数),运用 Fisher 精确检验;当  $n \geq 40$  且  $1 \leq T < 5$ ,需进行连续性校正;当

$n \geq 40$  且  $T \geq 5$ ,不需进行连续性校正。 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

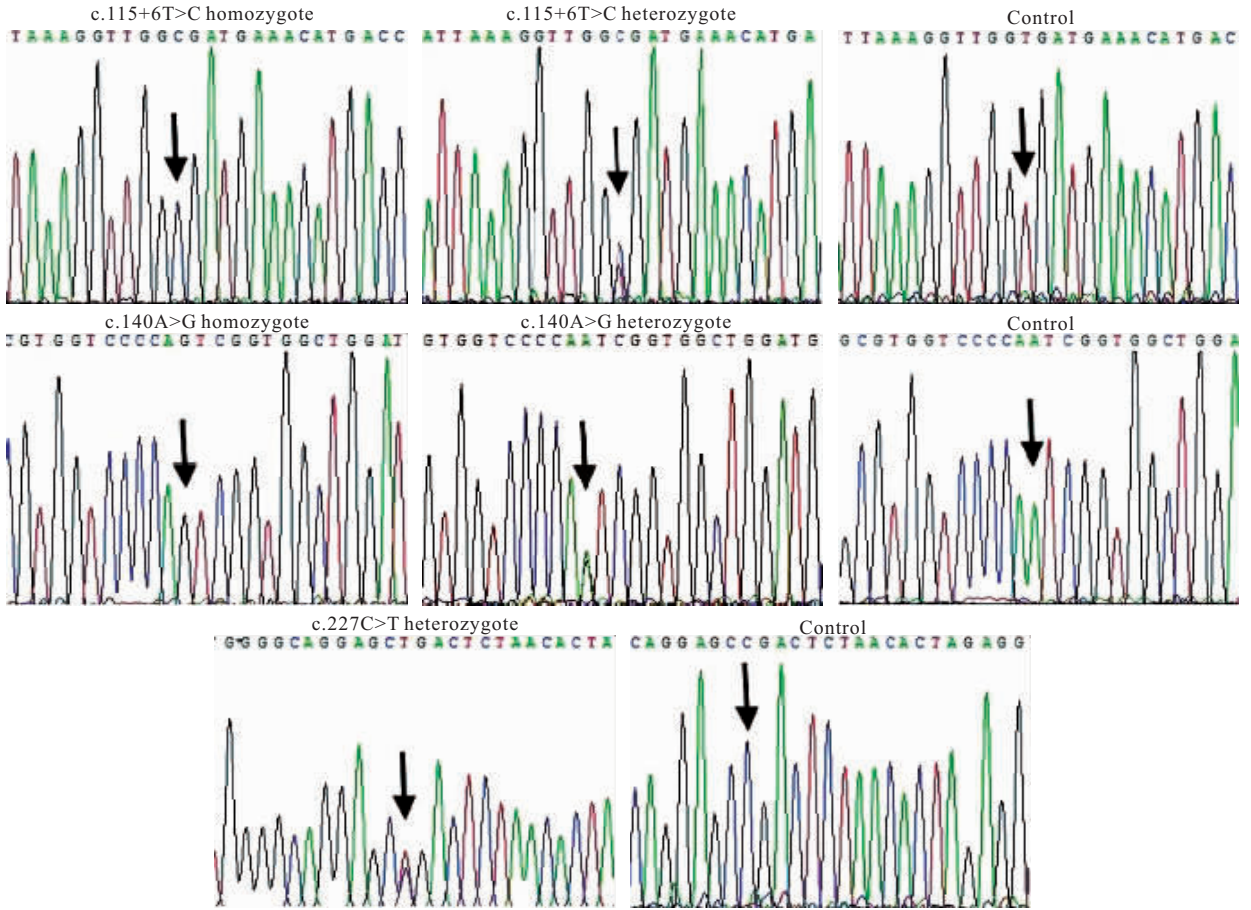
### 2.1 单纯性 GPP 组、PV 组和正常对照组间 *IL36RN* 基因突变频率的比较

对收集到的 24 例单纯性 GPP 患者、50 例 PV 患者及 50 例正常对照进行 *IL36RN* 基因测序,结果显示:在 19 例 GPP 患者(79.17%)中发现 3 个变异位点:c.115 + 6T > C (p. Arg10ArgfsX1, rs:148755083)、c.140A > G (p. Asn47Ser, rs:28938777)、c.227C > T (p. Pro76Leu, rs:139497891),其中,c.115 + 6T > C 变异频率最高为 70.83%(附图、表 2)。在 PV 组、正常对照组中则均未发现 *IL36RN* 基因变异,单纯性 GPP 组与 PV 组和正常对照组变异频率比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 PGPP 组与 AGPP 组 *IL36RN* 基因变异频率的比较

结果见表 2。PGPP 组与 AGPP 组 *IL36RN* 基因变异频率比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

但两组在突变类型上有所不同,PGPP 组患者中存在 c. 140A>G(p. Asn47Ser),但 AGPP 组中未发现此变异;AGPP 组患者中存在 c. 227C>T (p. Pro76Leu),而 PGPP 组中未发现此变异。



附图 样本中检测到的 *IL36RN* 所有突变位点

Fig Sequencing data of *IL36RN* variants in patients and in controls

表 2 *IL36RN* 基因各突变位点例数及突变频率

Table 2 Cases or frequency of *IL36RN* variants in different groups

Group	n	c. 115+6T>C (rs:148755083)				c. 140A>G (rs:28938777)				c. 227C>T (rs:139497891)			
		AA	Aa	aa	Variants/case (%)	AA	Aa	aa	Variants/case (%)	AA	Aa	aa	Variants/case (%)
GPP	24	7	2	15	17 (70.83) *	21	2	1	3 (12.50) *	21	3	0	3 (12.50) *
PGPP	12	3	1	8	9 (75.00) *	9	2	1	3 (25.00) *	12	0	0	0 (0)
AGPP	12	4	1	7	8 (66.67) *	12	0	0	0 (0)	9	3	0	3 (25.00) *
PV	50	50	0	0	0 (0)	50	0	0	0 (0)	50	0	0	0 (0)
Control	50	50	0	0	0 (0)	50	0	0	0 (0)	50	0	0	0 (0)

\*  $P<0.05$ , vs. PV and control groups. AA: No mutation; Aa: Heterozygous mutation; aa: Homozygous mutation

## 3 讨论

近年来 *IL36RN* 与 GPP 发病之间的关系逐渐被认识并确定。*IL36RN* 负责编码 IL-36 受体拮抗剂 IL-36Ra。IL-36Ra 在包括皮肤在内的上皮组织

中高度表达,属于 IL-1 家族。它可以通过竞争性拮抗 IL36 受体 IL-1RL2,抑制 IL36 $\alpha$ 、IL36 $\beta$ 、IL36 $\gamma$  对下游促炎症信号通路(MAPKs/NF- $\kappa$ B)的作用,避免炎症反应的发生<sup>[5,7]</sup>。当 *IL36RN* 发生突变时,其编码的 IL36Ra 结构发生改变,对 IL-1RL2 的拮

抗能力减弱甚至丧失,而  $IL-36\alpha$ 、 $IL-36\beta$ 、 $IL-36\gamma$  与  $IL-1RL2$  的结合则相应增加,通过激活下游促炎症信号通路,最终引起皮肤的炎症反应。

迄今,各国研究者在 GPP 患者中共发现 20 余个 *IL36RN* 突变位点,突变类型包括纯合突变、复合杂合突变及单杂合突变<sup>[8-9]</sup>。在非洲、欧洲、亚洲 GPP 患者中最常见突变位点分别为 c. 80T>C(p. Leu27Pro)、c. 338C>T(p. Ser113Leu)及 c. 115+6T>C(p. Arg10ArgfsX1)<sup>[5-6,10-14]</sup>。根据目前的研究资料,46.15%~81.82%的单纯性 GPP 患者携带 *IL36RN* 突变<sup>[8-9]</sup>。2013 年 LI 等<sup>[12]</sup>首次对中国 GPP 患者进行 *IL36RN* 的突变研究,发现 GPP 患者中 *IL36RN* 的突变发生率为 48.5%,其中最常见的突变类型为 c. 115+6T>C。2014 年 LI 等<sup>[14]</sup>对 62 个中国汉族 GPP 患者进行 *IL36RN* 突变检测,也得到了相似的结果,GPP 患者 *IL36RN* 的突变率为 46.77%,主要突变仍为 c. 115+6T>C。近来证实,在东亚人群 c. 115+6T>C 是一种建立者单倍体型(founder haplotype)<sup>[13,15]</sup>。

在本研究中,作为对照的 PV 组和正常对照组没有检测到任何 *IL36RN* 突变,但单纯性 GPP 组中 *IL36RN* 总的突变频率高达 79.17%,高于既往报道,表明 *IL36RN* 可能是四川地区汉族单纯性 GPP 患者的主要致病基因。

迄今在中国 GPP 患者中共发现了 8 个 *IL36RN* 突变位点,分别为 c. 115+6T>C(p. Arg10ArgfsX1)、c. 169G>A(p. Val57Ile)、c. 245C>T(p. Pro82Leu)、c. 140A>G(p. Asn47Ser)、c. 368C>T(p. Thr123Met)、c. 334G>A(p. Glu112Lys)、c. 227C>T(p. Pro76Leu)和 c. 305G>A(p. Arg102Gln),以 c. 115+6T>C 最常见<sup>[6,12-14]</sup>。本研究发现在四川地区汉族单纯性 GPP 患者中存在其中 3 种突变类型,即 c. 115+6T>C、c. 140A>G、c. 227C>T。其中,c. 115+6T>C 是最常见的突变类型,总的突变频率高达 70.83%,再次显示此位点确系中国单纯性 GPP 患者 *IL36RN* 基因的一大突变热点。c. 140A>G 和 c. 227C>T 则均较为少见,前者可能多出现于 PGPP,后者可能更常见于 AGPP。

一般认为,GPP 患者 *IL36RN* 突变的发生率与发病年龄有关。LI 等<sup>[6]</sup>发现,PGPP 患者 *IL36RN* 突变率(66.7%)远高于 AGPP 患者(34.2%),因此推测遗传因素在 PGPP 发病中发挥主要作用,而 AGPP 的发生可能还与环境等多因素有关。但在本

研究中,PGPP 组的 *IL36RN* 基因突变频率与 AGPP 组比较,差异并无统计学意义( $P>0.05$ ),显示 *IL36RN* 基因突变发生率可能与发病年龄无关,这与 LI 等<sup>[6]</sup>报道的有所不同。因本研究纳入例数有限,下一步有必要扩大样本量以最终明确两者间的差异。

总之,本研究首次通过收集四川地区具有典型单纯性 GPP 表现的汉族患者,检测其 *IL36RN* 基因突变的发生情况,结果发现:*IL36RN* 可能是四川地区汉族单纯性 GPP 患者的主要致病基因;四川地区汉族 GPP 患者中存在 3 种 *IL36RN* 突变类型,即 c. 115+6T>C、c. 140A>G、c. 227C>T,其中,c. 115+6T>C 最常见,是一突变热点;单纯性 GPP 的 *IL36RN* 变异频率可能与发病年龄无关。

GPP 一般被认为是银屑病的一种亚型,但其临床和组织病理学表现与其他类型银屑病均明显不同。本研究显示 GPP 患者发病与 *IL36RN* 基因突变密切相关,这与 PV 和 PsA 遗传易感性主要与 *HLA* 基因有关也有显著差异。结合国内外的相关研究,我们推测 GPP 本质上可能不是银屑病,而是一种独立的疾病。

## 参 考 文 献

- [1] CARAPITO R, ISIDOR B, GUEROUAZ N, *et al.* Homozygous *IL36RN* mutation and *NSD1* duplication in a patient with severe pustular psoriasis and symptoms unrelated to deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *Br J Dermatol*, 2015, 172(1): 302-305.
- [2] MANSOURI B, RICHARDS L, MENTER A. Treatment of two patients with generalized pustular psoriasis with the interleukin-1 $\beta$  inhibitor gevokizumab. *Br J Dermatol*, 2015, 173(1): 239-241.
- [3] 许 俨, 徐丽敏. 北方汉族银屑病家系 *HLA* 基因复合体相关研究. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2010, 9(1): 27-29.
- [4] FITZGERALD O, HAROON M, GILES JT, *et al.* Concepts of pathogenesis in psoriatic arthritis: genotype determines clinical phenotype. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 115. doi:10.1186/s13075-015-0640-3.
- [5] MARRAKCHI S, GUIGUE P, RENSHAW BR, *et al.* Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N Engl J Med*, 2011, 365(7): 620-628.
- [6] LI M, HAN J, LU Z, *et al.* Prevalent and rare mutations in *IL-36RN* gene in Chinese patients with generalized pustular psoriasis and psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(11): 2637-2639.
- [7] KUMAR S, MCDONNELL PC, LEHR R, *et al.* Identification and initial characterization of four novel

- members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*, 2000, 275 (14):10308-10314.
- [8] SUGIURA K, TAKEMOTO A, YAMAGUCHI M, *et al.* The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(11):2514-2521.
- [9] KÖRBER A, MÖSSNER R, RENNER R, *et al.* Mutations in IL36RN in patients with generalized pustular psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(11):2634-2637.
- [10] ONOUFRIADIS A, SIMPSON MA, PINK AE, *et al.* Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *Am J Hum Genet*, 2011, 89(3):432-437.
- [11] SUGIURA K, TAKEICHI T, KONO M, *et al.* A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p. Arg10X, in a Japanese patient with adult-onset generalized pustular psoriasis. *Br J Dermatol*, 2012, 167(3):699-701.
- [12] LI M, LU Z, CHENG R, *et al.* IL36RN gene mutations are not associated with sporadic generalized pustular psoriasis in Chinese patients. *Br J Dermatol*, 2013, 168(2):452-455.
- [13] WANG TS, CHIU HY, HONG JB, *et al.* Correlation of IL36RN mutation with different clinical features of pustular psoriasis in Chinese patients. *Arch Dermatol Res*, 2016, 308(1):55-63.
- [14] LI X, CHEN M, FU X, *et al.* Mutation analysis of the IL36RN gene in Chinese patients with generalized pustular psoriasis with/without psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*, 2014, 76(2):132-138.
- [15] FAROOQ M, NAKAI H, FUJIMOTO A, *et al.* Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum Mutat*, 2013, 34(1):176-183.

(2018 - 01 - 25 收稿, 2018 - 04 - 20 修回)

编辑 余琳

(上接第 569 页)

- [11] 李 镠, 刘 丹, 张 立, 等. 6458 例肺癌患者临床特征及诊疗现状分析. *四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(3):352-358.
- [12] ETTINGER DS, WOOD DE, AKERLEY W, *et al.* NCCN guidelines in sights: non-small cell lung cancer, Version 4. 2016. *J Nati Compr Canc Netw*, 2016, 14(3):255-264.
- [13] ONITSUKA T, URAMOTO H, NOSE N, *et al.* Acquired resistance to gefitinib the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status. *Lung Cancer*, 2010, 68(2):198-203.
- [14] 石远凯, 孙 燕, 于金明, 等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016 年版). *中国肺癌杂志*, 2016, 19(1):5-6.
- [15] CAICUN Z, YILONG W, GONGYAN C, *et al.* Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 2011, 12(8):735-742.
- [16] 林丽珠, 周岱翰, 郑心婷. 中医药提高晚期非小细胞肺癌患者生存质量的临床观察. *中国中西医结合杂志*, 2006, 26(5):389-393.
- [17] 刘慧慧, 王孟昭, 胡 克, 等. EGFR-TKIs 在非小细胞肺癌中耐药机制的研究进展. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(10):535-540.
- [18] 宋正波, 余新民, 蔡菊芬, 等. 埃克替尼在晚期非小细胞肺癌 EGFR 状态明确的患者中的疗效分析. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(3):139-142.
- [19] CHENG Y, MURAKAMI H, YANG PC, *et al.* Randomized phase II trial of gefitinib with and without pemetrexed as first-line therapy in patients with advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutations. *J Clin Oncol*, 2016, 34(27):3258-3266.
- [20] HAN B, JIN B, CHU T, *et al.* Combination of chemotherapy and gefitinib as first-line treatment for patients with advanced lung adenocarcinoma and sensitive EGFR mutations: a randomized controlled trial. *Int J Cancer*, 2016, 11(S4):S113-S114.
- [21] 丛 蕾, 崔言刚, 王潍博, 等. 晚期非小细胞肺癌化疗预后因素的 COX 回归分析. *中国癌症杂志*, 2009, 19(4):280-283.
- [22] 李俊杰, 曲莉莉, 卫 星, 等. EGFR-TKIs 一线治疗 EGFR 基因突变的晚期非小细胞肺癌临床观察. *中国肺癌杂志*, 2012, 15(5):299-304.
- [23] 刘仁旺, 刘京豪, 李 昕, 等. EGFR19 和 21 外显子突变肺癌患者的临床特征比较和预后分析. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(11):804-811.

(2017 - 12 - 08 收稿, 2018 - 04 - 01 修回)

编辑 别明江