

· 基础研究 ·

冻结肩与正常人 IL-1 和受体拮抗剂的基因多态性[△]申成凯¹, 臧业峰¹, 刘坤¹, 吕成昱², 赵海军^{1*}

(1. 青岛市胶州中心医院, 山东胶州 266300; 2. 青岛大学附属医院, 山东青岛 266300)

摘要: [目的] 探索冻结肩 (frozen shoulder, FS) 与 IL-1 β 和白细胞介素-1 受体拮抗剂 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra) 的基因多态性的相关性。[方法] 选取 2021 年 1 月—2023 年 8 月在青岛市胶州中心医院就诊的 225 例原发性或有该病史的患者为冻结肩组, 另 275 名正常人为正常组。通过聚合酶链反应和限制性片段长度多态性方法检测两组 IL-1 β 基因位点的基因型, 分析其单倍体与冻结肩患病风险率之间的相关性, 并分析 IL-1 受体拮抗剂等位基因 2 (interleukin-1 receptor antagonist allele*2, IL-1RN) 不同基因型与冻结肩患病易感性的相关性。[结果] 与野生型 CC (未发生基因突变的基因型) 相比, 杂合子 CT 基因型 (发生基因突变) 的患者发生 FS 的风险显著升高 ($OR=1.952$, $95\%CI$ 1.142~3.320, $P=0.014$), 同时, IL-1B+3954 位点的 C 基因可能是保护基因, IL-1B+3954 位点具有 C 基因发生 FS 的风险显著降低 ($OR=0.577$, $95\%CI$ 0.309~0.987, $P=0.049$)。IL-1B-31C/T 位点 CT 基因型发生 FS 的风险显著高于 TT 型 ($OR=1.791$, $95\%CI$ 1.171~2.742, $P=0.004$)。单倍体型分析发现, 与最常见的 CCT 单体型相比较, 单体型 TTT 与 FS 高风险发病率具有更强的相关性 ($OR=7.100$, $95\%CI$ 1.492~33.870, $P=0.014$)。经非条件逻辑回归分析发现, IL-1RN (VNTR) 的 4 种基因在两组之间的分布差异无统计学意义 ($P=0.521$), IL-1RN 基因变异型组 (1/2 和 2/2) 发生 FS 的风险是非变异组 (1/1、1/3、1/4) 的 1.895 倍, 但结果差异无统计学意义 ($P>0.05$)。[结论] 在冻结肩组中 IL-1 β 基因 rs1143627 与 rs1143634 位点的 CT 基因型与冻结肩的易感性相关; 由 3 个基因位点形成的单倍体型 TTT 可能会增加罹患冻结肩的风险, 在 IL-1RN 中未发现冻结肩的易感基因型。

关键词: 白细胞介素-1 β , 白细胞介素-1 受体拮抗剂, 冻结肩**中图分类号:** R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2024) 24-2257-08

Genetic polymorphism of IL-1 and receptor antagonists in frozen shoulder and normal subjects // SHEN Cheng-kai¹, ZANG Ye-feng¹, LIU Kun¹, LÜ Cheng-yu², ZHAO Hai-jun¹. 1. Qingdao Jiaozhou Central Hospital, Jiaozhou, Shandong 266300, China; 2. Affiliated Hospital, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266300, China

Abstract: [Objective] To explore the relationship between frozen shoulder (FS) and gene polymorphism of IL-1 β and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). [Methods] From January 2021 to August 2023, 225 patients who were treated in our hospital were selected as the frozen shoulder group, while other 275 normal persons as the normal group. The genotypes of the two groups in IL-1 β gene loci were detected by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. The correlation between the haploids and the risk rate of frozen shoulder disease was analyzed. In addition, the correlation between different genotypes of interleukin-1 receptor antagonist allele*2, (IL-1RN) and the susceptibility to frozen shoulder disease was also analyzed. [Results] Compared with wild-type CC (non-mutated genotype), patients with heterozygous CT genotype (mutated genotype) had a significantly higher risk of FS ($OR=1.952$, $95\%CI$ 1.142~3.320, $P=0.014$). The C gene at the IL-1B+3954 locus may be a protective gene, and the risk of FS in the C gene was significantly reduced at the IL-1B+3954 locus ($OR=0.577$, $95\%CI$ 0.309~0.987, $P=0.049$). The risk of FS for CT genotype at IL-1B-31C/T locus was significantly higher than that for TT genotype ($OR=1.791$, $95\%CI$ 1.171~2.742, $P=0.004$). Haplotype analysis found that haplotype TTT was more strongly associated with a higher risk of FS than the most common CCT haplotype ($OR=7.100$, $95\%CI$ 1.492~33.870, $P=0.014$). Unconditional Logistic regression analysis showed that there was no statistically significant difference in the distribution of four genes of IL-1RN (VNTR) between the two groups ($P=0.521$), and the risk of FS in the IL-1RN variant group (1/2 and 2/2) was 1.895 times higher than that in the non-variant group (1/1, 1/3, 1/4), whereas which was not statistically significant ($P>0.05$). [Conclusion] CT genotypes of IL-1 β gene rs1143627 and rs1143634 were associated with susceptibility to frozen shoulder in frozen shoulder group. Haplotype TTT formed by three gene loci may increase the risk of frozen shoulder, and no susceptibility genotype for frozen shoulder was found in IL-1RN.

DOI:10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100799

△基金项目: 青岛市医药卫生科研指导项目 (编号:2021-WJZD124); 2022—2024 年青岛市市级临床重点专科骨外科资助项目**作者简介:** 申成凯, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 冻结肩的发病机制, (电子信箱) shenchengkai2010@126.com*** 通信作者:** 赵海军, (电子信箱) zhj13954266767@163.com

Key words: Interleukin-1 β , interleukin-1 receptor antagonist, frozen shoulder

冻结肩 (frozen shoulder, FS) 也被称为粘连性肩关节囊炎, 是一种表现为肩关节主动和被动活动受限的疾病, 活动丧失是由于关节囊炎性挛缩造成的, 最终导致肩关节囊纤维化、活动受限^[1]。主要发生在 40~60 岁女性, 发病率为 2%~5%^[2], 在糖尿病患者中可增加至 10.8%~29%^[3], 血脂异常和高血压似乎也增加 FS 的发病风险, 甲状腺功能减退也是 FS 的危险因素, 尤其是女性^[4]。种族差异、遗传变异也被人们不断的纳入研究, 目前 FS 的病因尚不清楚, 遗传因素可能与 FS 的易感性相关, 据估计遗传因素占 42% 的风险。

IL-1 家族主要包括配体、IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1Ra)。编码这 3 种蛋白的基因 IL-1A、IL-1B 及 IL-1RN 均位于染色体 2q13-24, 具有较高的同源性, 构成 IL-1 基因簇^[5]。白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) (主要是 IL-1 β) 是前炎症反应的中心介质之一, 研究表明, IL-1 β 反应性与遗传背景有关, 而且在不同的种族中其多态性呈现不同的分布频率。IL-1 的某些基因多态性能够影响 IL-1 相关基因的转录及蛋白表达, 使得体内细胞因子的水平发生改变, 从而增加 FS 的易感性。国内外大量文献报道, IL-1 受体拮抗剂等位基因 2 (interleukin-1 receptor antagonist allele*2, IL-1RN*2) 与许多慢性炎症及自身免疫疾病相关, 据推测可能与携带者体内 IL-1 受体拮抗剂 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra) 的水平发生错误表达有关^[6]。FS 是逐渐发展的慢性疾病, 是遗传和环境因素共同作用的结果。研究发现, IL-1 β -31、IL-1 β -511、IL-1 β +3954 启动子区域以及 IL-1RN 基因 VNTR 内含子 2 的多态性与 IL-1 β 的分泌异常和更严重疾病的风险增加有关^[7]。本研究旨在研究 FS 患者和正常人群 IL-1B 基因中 rs16944、rs1143634、rs1143627、IL-1RN VNTR 位点基因型的分布及其形成单倍体基因型与 FS 发病率的相关性, 试图帮助早期识别发生 FS 的高风险人群。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例组选取 2021 年 1 月—2023 年 8 月在青岛市胶州中心医院就诊的 225 例原发性或有该病病史的患者, 所有病例分别经两名运动医学科专家共同诊断确

定。

纳入标准^[8]: (1) 肩关节疼痛至少 1 个月; (2) 肩关节被动活动受限, 且 X 线片显示无明显异常; (3) MRI 提示肩关节囊增厚, 尤其在腋囊区更明显, 喙肱韧带增粗, 未发现肩袖、孟唇、肱二头肌长头以及肩锁关节病理改变; (4) 无心血管疾病、甲状腺疾病、糖尿病等风险因素。

排除标准: (1) 肩关节疼痛其他相似疾病: 肩袖部分或全层撕裂, 肱二头肌肌腱炎, 钙化性肌腱炎; (2) 肩周创伤后继发性疼痛: 既往肱骨干骨折、肩锁关节脱位、锁骨骨折继发肩关节疼痛, (3) 肩痛患者, 既往有颈神经根病、脑血管意外病史; (4) 内分泌失调性肩关节疼痛: 甲状腺功能亢进症、甲状腺功能减退症、肾上腺功能减退症。

正常人组选自本院健康体检中心的 275 位志愿者, 既往无原发性病史, 经物理检查及实验室检查无排除标准中的疾病。两组年龄、性别、BMI 的差异均无统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。本研究经医院伦理委员会审核通过, 参与者均在数据和样本收集之前签署书面知情同意书。

表 1. 两组一般资料比较

指标	正常人组 (n=275)	FS 组 (n=225)	P 值
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	52.7 \pm 9.0	53.5 \pm 11.7	0.437
性别 (例, 男/女)	100/175	80/145	0.910
BMI (kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	23.2 \pm 1.3	23.3 \pm 3.2	0.478

1.2 DNA 提取

使用含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的试管从 FS 患者及健康志愿者外周静脉穿刺采集 5 ml 静脉血, 并于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。采用非离心柱型血液基因组 DNA 提取系统试剂盒 (TIANGEN BIOTECH) 从全血中提取 DNA, 采用分光光度计测定 DNA 纯度, 当 OD260/OD280 为 1.6~2.0 时, 说明 DNA 纯度合格, 纳入实验, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 PCR 扩增、基因测序、SNP 分型

应用 PCR 技术对所选的 IL-1B 的 3 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点的基因序列进行扩增, 然后取 PCR 反应产物加入相应的限制性内切酶进行酶切, PCR 扩增与酶切产物均送上海美吉生物医药科技有限公司进行 DNA 序列测

定，确定基因分型；将 IL-1RN 的 PCR 扩增产物放入 2% 琼脂糖凝胶电泳，根据凝胶成像系统显示的结

果确定基因类型。引物序列、反应条件及限制性内切酶详见表 2。

表 2. IL-1B 基因 3 个 SNP 位点及 IL-1RN 的 PCR 引物及扩增条件
Table 2. PCR primers and amplification conditions for three SNPS of IL-1B gene and IL-1RN

SNP 位点	PCR 引物序列 (5'-3')	PCR 扩增条件	内切酶
rs16944	F: 5' TGGCATTGATCTGGTTCATC3', R: 5' GTTTGAGAATCTTCCAC 3' ^[9]	95℃预变性 5 min, 然后按 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 35 s 的顺序进行 33 个循环 最后 72℃ 延伸 10 min	Apa I
rs1143634	F: 5' GTTGCATCAGACTTTGACC3', R: 5' TTCAGTTCATATGGACCCAGA3' ^[10]	95℃预变性 5 min, 然后按 98℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s 的顺序进行 33 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min	Taq I
rs1143627	F: 5' TCTTTCCCTTTCTTTAAC3', R: 5' GAGAGACTCCCTTAGCACCTA3' ^[11]	95℃预变性 5 min, 然后按 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s 的顺序进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min	Alu I
IL-1RN VNTR	F: 5' CTCAGCAACTCTCTAT3' R: 5' TCCTGGTCTGCAGGTAA3' ^[12]	94℃预变性 5 min, 然后按 97℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 35 s 的顺序进行 33 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min	-

1.4 统计学方法

主要软件包括 SPSS 19.0、PHASE (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) 和 SNPstats。

采用 SPSS 进行两独立样本的 *t* 检验、卡方检验；统计学处理连锁不平衡分析中的 *D'* 值由 PHASE 软件完成，采用 SNPstats 进行正常人组 (Hardy-Weinberg, H-W) 遗传平衡检验及患病风险比值比 (odds ratio, OR)，采用 PHASE 软件评估多位点所构建的单体型及连锁不平衡与 FS 的发病风险。根据不同位点连锁不平衡概率及单倍体出现频率差异计算，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA 的测定和 PCR 产物、酶切、测序结果

本研究所提取的 DNA 浓度为 60~300 ng/ml，DNA 纯度，OD260/OD280 为 1.6~2.0。

将 IL-1B rs16944、rs1143634、rs1143627 三个位点的 PCR 扩增产物型基因测序并分型。测序分型后取部分样本给予行酶切电泳验证测序结果。测序结果见图 1。

IL-1RN 的 PCR 扩增产物经过 2.0% 琼脂糖凝胶 80 V 电泳 100 min 后，在紫外灯下根据电泳结果对研究对象行基因型分类。IL-1RN 是插入/缺失基因多态性，扩增 PCR 产物片段长度可变，根据串联重复不同分割成为 240 bp、325 bp、410 bp、500 bp 4 个片段，形成 4 种基因型 (图 1)。

2.2 两组 IL-1B 等位基因和基因型频率相关性

正常人组中每一组研究的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。IL-1B 基因位点-511C/T，+3954C/T，-31C/T 多态性的等位基因与基因型频率的计数及基因型的 OR 值计算 (表 3)。在 FS 患者中，IL-1B-511C/T 位点基因型分布与正常人组差异无统计学意义 (*P*>0.05)，等位基因 T 和等位基因 C 之间的差异也无统计学意义 (*P*>0.05)。IL-1B+3954C/T 位点未发现 TT 基因型，等位基因 T 与等位基因 C 在两组分布比例差异有统计学意义 (*P*<0.05)，CT 基因型的出现概率在 FS 组中明显增加，与正常人组差异有统计学意义 (*P*<0.05)。通过计算 OR 和 95%CI 来估计基因型与 FS 之间的关联性，结果显示，与野生型 CC (未发生基因突变的基因型) 相比，杂合子 CT 基因型 (发生基因突变) 的患者发生 FS 的风险显著升高 (OR=1.952, 95%CI 1.142~3.320, *P*=0.014)，同时，IL-1B+3954 位点的 C 基因可能是保护基因，IL-1B+3954 位点具有 C 基因发生 FS 的风险显著降低 (OR=0.577, 95%CI 0.309~0.987, *P*=0.049)。IL-1B-31C/T 位点 CT 基因型发生 FS 的风险显著高于 TT 型 (OR=1.791, 95%CI 1.171~2.742, *P*=0.004)，两组包含的 T 等位基因与 C 等位基因频率差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

2.3 IL-1B 基因的单倍体型分析

经 SNPstat 单体型分析，发现 8 种单体型，在这 8 种单体型发生的频率中，最常见的 CCT 单体型在 FS 组和正常人组分别占 20.6%和 31.0%。运用单倍体

型分析发现，与最常见的 CCT 单体型相比较，单体型 TTT 与 FS 高风险发病率具有更强的相关性，两组

差异具有统计学意义 ($OR=7.100$, $95\% CI 1.492\sim 33.870$, $P=0.014$) (表 4)。

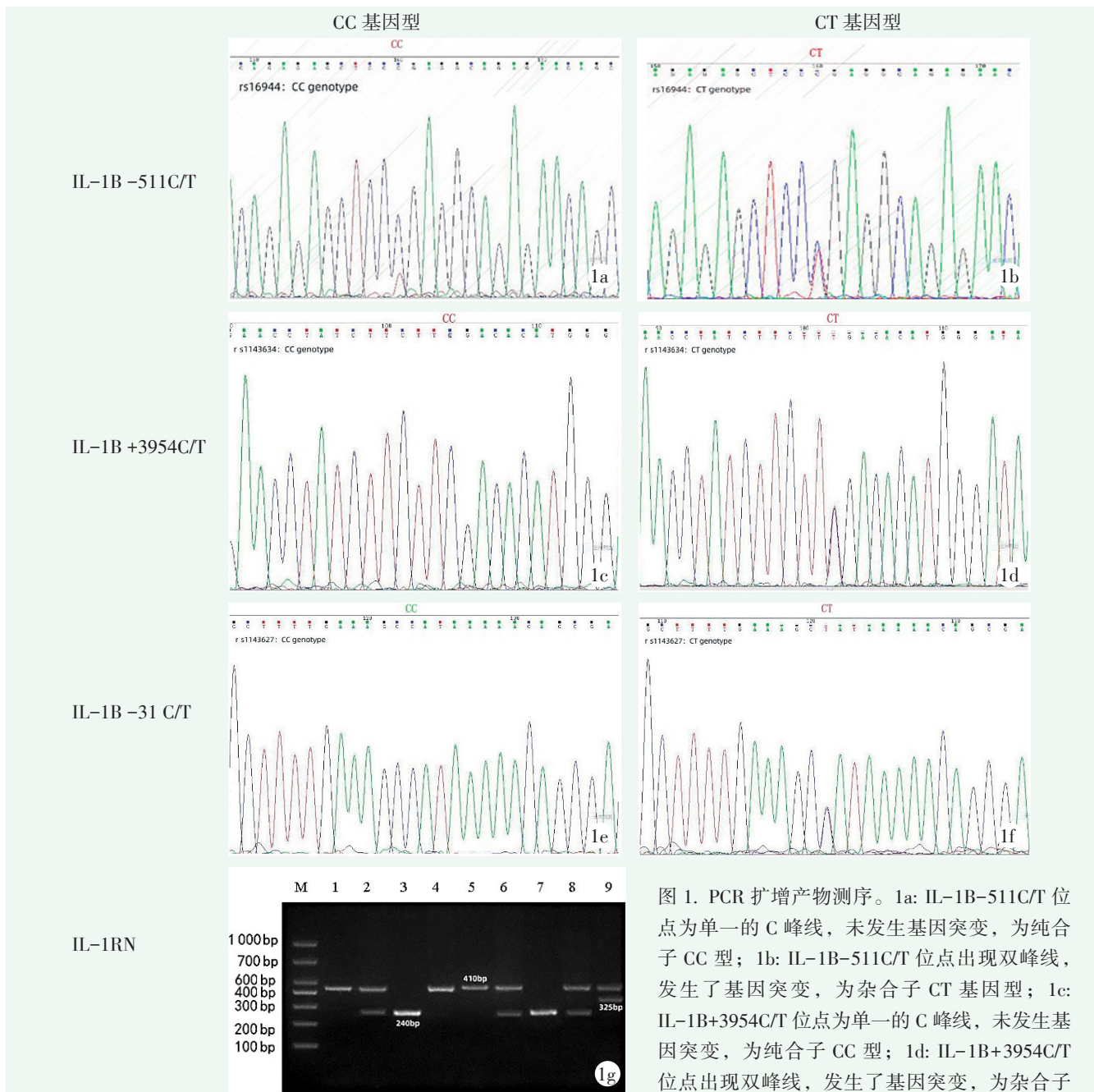


图 1. PCR 扩增产物测序。1a: IL-1B-511C/T 位点为单一的 C 峰线，未发生基因突变，为纯合子 CC 型；1b: IL-1B-511C/T 位点出现双峰线，发生了基因突变，为杂合子 CT 基因型；1c: IL-1B+3954C/T 位点为单一的 C 峰线，未发生基因突变，为纯合子 CC 型；1d: IL-1B+3954C/T 位点出现双峰线，发生了基因突变，为杂合子

CT 基因型；1e: IL-1B-31C/T 位点为单一的 C 峰线，未发生基因突变，为纯合子 CC 型；1f: IL-1B-31C/T 位点出现双峰线，发生了基因突变，为杂合子 CT 基因型；1g: IL-1RN 基因通过 PCR-RFLR 方法确定基因类型，泳道 1、4、5 为 1/1 型 (1 条 410 bp 的片段)，泳道 2、6 为 1/2 型 (410 bp 和 240 bp 2 条片段)，泳道 9 为 1/4 型 (410 bp 和 325 bp 2 条片段)，泳道 3、7 位 2/2 型 (1 条 240 bp 的片段)。

Figure 1. PCR amplified product sequencing. 1a: IL-1B-511C/T locus was a single C peak line without gene mutation and was homozygous CC type; 1b: Because of the genetic mutation, the IL-1B-511C/T site has a double-humped line, and it was a heterozygote CT genotype; 1c: IL-1B +3954C/T site was a single C peak line without gene mutation, and was homozygous CC type; 1d: Because of the genetic mutation, the IL-1B +3954C/T site has a double-humped line and it was a heterozygote CT genotype; 1e: IL-1B-31 C/T site is a single C peak line without gene mutation and was homozygous CC type; 1f: Because of the genetic mutation, the IL-1B-31 C/T site has a double-humped line, and it was a heterozygote CT genotype; 1g: The genotype of IL-1RN gene was determined by PCR-RFLR method. Lanes 1, 4 and 5 were classified as type 1/1 (a fragment of 410 bp), lanes 2 and 6 as type 1/2 (two fragments of 410 bp and 240 bp), and lane 9 as type 1/4 (two fragments of 410 bp and 325 bp). Lanes 3, 7 as type 2/2 (a 240 bp segment).

表 3. 两组基因型频率的分布差异及基因型与 FS 风险性非条件逻辑回归分析

Table 3. The distribution difference of genotype frequency between the two groups and unconditional Logistic regression of the risk of FS and genotype

基因型	正常人组 (n=275)	FS 组 (n=225)	P 值	OR (95%CI)
IL-1B-511C/T (例, %)				
TT	88 (32.0)	67 (29.8)	-	1.000
CT	118 (42.9)	101 (44.9)	-	1.122 (0.740~1.702)
CC	69 (25.1)	57 (25.3)	0.860	1.090 (0.678~1.741)
等位基因 T	294 (53.5)	235 (52.2)	-	1.000
等位基因 C	256 (46.5)	215 (47.8)	0.660	1.083 (0.763~1.552)
IL-1B+3954C/T (例, %)				
CC	249 (90.5)	187 (83.1)	-	1.000
CT	26 (9.5)	38 (16.9)	-	1.952 (1.142~3.320)
TT	0 (0)	0 (0)	0.014	-
等位基因 T	26 (4.0)	38 (8.4)	-	1.000
等位基因 C	524 (95.1)	412 (91.5)	0.049	0.577 (0.309~0.987)
IL-1B-31T/C (例, %)				
TT	83 (30.2)	50 (22.3)	-	1.000
CT	128 (46.5)	138 (61.3)	-	1.791 (1.171~2.742)
CC	64 (23.3)	37 (16.4)	0.004	0.962 (0.561~1.643)
等位基因 T	294 (53.5)	238 (52.9)	-	1.000
等位基因 C	256 (46.5)	212 (47.1)	0.850	1.820 (1.271~2.610)

表 4. FS 组和正常人组单倍体型频率分布

Table 4. Haplotype frequency distribution in frozen shoulder group and normal group

rs16944	rs1143634	rs1143627	正常人组频率	FS 组频率	单体型频率	OR (95% CI)	P 值
C	C	T	0.3104	0.2060	0.2739	1.000	-
T	C	C	0.3062	0.1991	0.273	1.032 (0.703~1.520)	0.623
T	C	T	0.2083	0.2827	0.2273	1.513 (0.9791~2.311)	0.371
C	C	C	0.1278	0.2278	0.1618	1.948 (1.121~3.400)	0.064
C	T	C	0.0182	0.0144	0.0217	1.653 (0.424~6.487)	0.130
T	T	T	0.0067	0.0106	0.0173	7.100 (1.492~33.870)	0.014
T	T	C	0.0133	0.0299	0.0136	3.041 (0.732~12.658)	0.842
C	T	T	0.0091	0.0295	0.0114	0.860 (0.020~35.822)	0.621

2.4 IL-1RN 基因串联重复多态性与 FS 易感性关联性

IL-1RN 基因串联重复 (variable number of tandem repeats, VNTR) 多态性: IL-1RN (VNTR) 多态性通过聚合酶链反应和限制性片段长度多态性方法发现 3 种等位基因和 4 种基因型, 其中 1/1 基因型仅有一条 410 bp 的片段, 1/2 型为 410 bp 和 240 bp 两条片段, 1/4 型为 410 bp 和 325 bp 两条片段, 2/2 型为一条 240 bp 的片段, 本研究中未发现 1/3 基因型,

本研究将发现例数最多的 1/1 基因型定义为野生型; 含有 2 型等位点的基因型设为变异型, 变异型基因有 1/2 和 2/2。通过风险性非条件逻辑回归分析发现, IL-1RN (VNTR) 的 4 种基因在两组之间的分布差异无统计学意义 ($P=0.521$), IL-1RN 基因变异型组 (1/2 和 2/2) 发生 FS 的风险是非变异组 (1/1、1/3、1/4) 的 1.895 倍, 但结果差异无统计学意义 ($OR=1.895, 95\%CI 0.535\sim6.037, P=0.811$)。详见表 5。

表 5. 两组 IL-1RN 基因型频率的分布差异及与 FS 患病风险性非条件逻辑回归分析

Table 5. Distribution differences of IL-1RN genotype frequencies between the two groups and unconditional Logistic regression analysis

基因型	FS 组 (n, %)	正常人组 (n, %)	OR 值 (95%CI)	P 值
1/1	162 (72.0)	199 (72.4)	1.000	-
1/2	48 (21.3)	59 (21.5)	1.702 (0.542~5.132)	-
2/2	11 (4.9)	12 (4.4)	1.642 (0.332~6.118)	-
1/3	0 (0.0)	0 (0.0)	0.000 (0.000~0.000)	-
1/4	4 (1.8)	5 (1.7)	1.002 (0.025~13.430)	0.521
1/1+1/3+1/4	166 (73.8)	204 (74.2)	1.000	-
1/2+2/2	59 (26.2)	71 (25.8)	1.895 (0.535~6.037)	0.811

3 讨论

FS 是一种常见的疾病，可导致严重的肩关节活动受限，滑膜纤维化在 FS 中发挥重要的作用，滑膜纤维化的特征是成纤维细胞增殖和胶原合成与胶原降解之间的不平衡。这种不平衡导致胶原蛋白过度沉积在细胞外基质中，导致滑膜增厚和僵硬。Rodeo^[13] 报道 IL-1 β 、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、I 型胶原 α 1 链 (type I collagen α 1 chain, COL1A1) 和金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3) 基因多态性可能参与 FS 的发生发展。IL-1 β 、MMP-3、TGF- β 1 和 COL1A1 在组织纤维化中起重要作用。这可能与受到异常表达的细胞因子调节有关，炎症细胞因子的基因变异也决定了发病率不同。据报道，炎症介质如 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 在炎症反应和胶原分解代谢中起重要作用^[14]。导致 FS 发病的因素是多种多样的，但主要围绕炎症和纤维化途径。在全身性或局部炎症过程中，IL-1 β 可启动免疫应答、炎症反应，通常情况下，滑液中 IL-1 β 含量较低，但当肩部损伤或炎症形成后，组织会释放 IL-1 β ，导致滑液 IL-1 β 水平显著升高^[15]。在这些炎症细胞因子中，关节囊中的 TNF- α 、COX-1 和 COX-2 以及肩峰下囊中的 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 和 COX-2 被发现过度表达^[16]。在关节囊或盂肱关节滑膜中，IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- β 的水平升高在 FS 发病中起重要作用^[17]。目前炎症细胞因子的基因遗传对肩部疾病的影响越来越受到关注，如肩袖损伤、不稳定和 FS。虽然初步研究结果具有启发性，但有必要逐步建立基因组谱数据库，有助于预测疾病的风险，以及成为诊断和治疗的重要工具。

本研究评估了 IL-1B 和 ILRN 基因多态性在 FS

发生、发展中引起炎症反应的可能作用。这些基因多态性的影响在很多慢性炎症疾病中得到证实。Cho 等^[18] 发现，在韩国人群中 IL-1B rs1143627 基因多态性与低剂量阿司匹林诱导的胃溃疡的关系，与 IL-1B-31T/C CT 基因型相比，CC 基因型明显增加低剂量阿司匹林诱导的胃溃疡的发病风险。2022 年，Zheng 等^[19] 的荟萃分析发现白种人 IL-1B rs16944 位点多态性与败血症风险相关。另外 Kapelski^[20] 通过对波兰 621 例精神分裂症患者和 531 例健康人的 IL-1 和 IL-1 受体基因多态性分析，发现 IL-1B 基因位点：rs1143634，rs1143643，rs16944，rs4848306，rs1143623，rs1143633，rs1143627 位点之间存在强的连锁平衡。FS 发病机制方面的研究主要包括炎症和纤维化对该病的作用，然而这些研究尚不能阐述 FS 的具体发病机制。本研究首次探讨 IL-1B rs16944、rs1143634、rs1143627 及 ILRN VNTR 多态性与 FS 易感性的关系，可能在分子生物学领域初步揭示 FS 的发病遗传因素。

本实验发现与野生型 CC 相比，rs1143634 位点的杂合子 CT 基因型的患者发生 FS 的风险明显升高 (OR=1.952, 95% CI 1.142~3.320, P=0.014)，同时 rs1143634 位点的 C 基因是保护基因，在 rs1143634 位点具有 C 基因发生 FS 的风险降低 (OR=0.577, 95%CI 0.309~0.987, P=0.049)。rs1143627 位点 CT 基因型发生 FS 的风险显著高于 TT 型 (OR= 1.791, 95% CI 1.171~2.742, P=0.004)。通过单倍体差异分析，发现这 3 个位点连锁组成的单倍体型 TTT 与 FS 高风险发病率具有较强的相关性 (TTT. OR=7.100, 95%CI 1.492~33.870, P=0.014)。Smith 等^[21] 通过 17 个多态位点的连锁不平衡分析发现，IL-1R1 启动子和 IL-1A-IL-1B-IL-1RN 复合体存在强连锁不平衡，同样的，还发现在 IL-1A-IL-1B-IL-1RN 复合体基因内存在强的连锁不平衡。实验发现，IL-1RN (VNTR)

的 4 种基因型，在两组之间出现频率差异无明显统计学意义 ($P=0.521$)。IL-1RN 基因变异型 (1/2 和 2/2) 发生 FS 的风险系数是正常人组的 1.955 倍，但是差异缺乏统计学意义 ($OR=1.955$, $95\% CI$ 0.635~5.437, $P=0.825$)。Zhang 等^[22]证实了 IL-1RN VNTR 多态性与幽门螺杆菌感染之间的显著关联，特别是在亚洲人。国内外关于 IL-1RN (VNTR) 多态性与 FS 的相关性研究相对较少，而且结论不一，这可能与选择样本的地域差异、种族差异、诊断标准等原因相关，下一步需要收集更多的数据，更详细的资料，得出更为准确的结论。

目前，对 FS 的研究主要集中在病理学方面、影像学研究、临床诊断和治疗，对潜在的发病机制、遗传变异研究明显不足，通过本实验研究找到一些突破，但也存在一些局限性：首先，基因研究的样本量很小，虽然证明了对遗传变异的评估可能有助于理解 FS 的病因学；在更大的人群中进行验证仍然是必要的；其次， P 值没有进行多重比较的调整。然而，基因变异是否根据其在组织中的功能来合理选择，尚且不明，虽然本研究的样本量不大，但这些数据对 FS 潜在遗传病因的理解以及发病机制提供了参考，后期会通过更多的数据研究支持临床实践，在早期筛查 FS 时，IL-1 也许能作为一种特异性的标志物。

参考文献

- [1] Tamai K, Akutsu M, Yano Y. Primary frozen shoulder: brief review of pathology and imaging abnormalities [J]. *J Orthop Sci*, 2014, 19 (1): 1-5. DOI: 10.1007/s00776-013-0495-x.
- [2] 刘洋, 印凡, 许兵. 冻结肩的诊断与治疗研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2012, 20 (19): 1771-1773. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2012.19.13.
Liu Y, Yin F, Xu B. Advances in diagnosis and treatment of frozen shoulder [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2012, 20 (19): 1771-1773. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2012.19.13.
- [3] Wang K, Ho V, Hunter-Smith DJ. Risk factors in idiopathic adhesive capsulitis: a case control study [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2013, 22: e24-e29. DOI: 10.1016/j.jse.2012.10.049.
- [4] Austin DC, Gans I, Park MJ. The association of metabolic syndrome markers with adhesive capsulitis [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2014, 23 (7): 1043-1051. DOI: 10.1016/j.jse.2013.11.004.
- [5] 熊伟. IL-1 家族及其受体与骨关节炎 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11 (5): 337-338. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478(2003)05-0337-02.
Xiong W. IL-1 family and its receptors and osteoarthritis [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2003, 11 (5): 337-338. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478(2003)05-0337-02.
- [6] Hakim AJ, Cherkas LF, Spector TD. Genetic associations between frozen shoulder and tennis elbow: a female twin study [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2003, 42 (6): 739-742. DOI: 10.1093/rheumatology/keg159.
- [7] Kayar NA, Alptekin NÖ, Erdal ME. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, adverse pregnancy outcome and periodontitis in Turkish women [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60 (12): 1777-1783. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.09.013.
- [8] Carina C, Mariana FL. Genetic variants involved in extracellular matrix homeostasis play a role in the susceptibility to frozen shoulder: a case-control study [J]. *Orthop Res*, 2019, 37 (4): 948-956. DOI: 10.1002/jor.24228.
- [9] Fu LY, Qiu XT, Deng QL. The IL-1B gene polymorphisms rs16944 and rs1143627 contribute to an increased risk of coronary artery lesions in Southern Chinese children with Kawasaki disease [J]. *J Immunol Res*, 2019, 49: 4730507. DOI: 10.1155/2019/4730507.
- [10] Cardoso JM, Ribeiro AC, Palos C. Association between IL-1A and IL-1B gene polymorphisms with peri-implantitis in a Portuguese population—a pilot study [J]. *Peer J*, 2022, 10: e13729. DOI: 10.7717/peerj.13729.
- [11] Kalsoom F, Ur-Rahman S, Mahmood MS, et al. Association of interleukin-1B gene polymorphism with H. pylori infected dyspeptic gastric diseases and healthy population [J]. *Pak J Med Sci*, 2020, 36 (4): 825-830. DOI: 10.12669/pjms.36.4.1883.
- [12] Barakat SH, Meheissen MA, El-Gendi SM, et al. Interleukin-1b and Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in pediatric patients with helicobacter pylori-associated chronic gastritis [J]. *J Trop Pediatr*, 2021, 67 (3): 1-10. DOI: 10.1093/tropej/fmab061.
- [13] Rodeo SA, Hannafin JA, Tom J, et al. Immunolocalization of cytokines and their receptors in adhesive capsulitis of the shoulder [J]. *J Orthop Res*, 1997, 15 (3): 427-436. DOI: 10.1002/jor.1100150316.
- [14] Blaine TA, Kim YS, Voloshin I, et al. The molecular pathophysiology of subacromial bursitis in rotator cuff disease [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2005, 14 (1): S84-S89. DOI: 10.1016/j.jse.2004.09.022.
- [15] 胡滨, 刘宁, 袁鹏, 等. 术前滑液细胞因子与镜下肩袖撕裂修复预后 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (6): 497-501. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.06.04
Hu B, Liu N, Yuan P, et al. Correlation between preoperative synovial cytokines and prognosis of arthroscopic repair for rotator cuff tear [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2022, 6 (3): 497-501. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.06.04.
- [16] Lho YM, Ha E, Cho CH, et al. Inflammatory cytokines are overexpressed in the subacromial bursa of frozen shoulder [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2013, 22: 666-672. DOI: 10.1016/j.jse.2012.06.014.
- [17] Kabbabe B, Ramkumar S, Richardson M. Cytogenetic analysis of the pathology of frozen shoulder [J]. *Int J Shoulder Surg*, 2010, 4: 75-78. DOI: 10.4103/0973-6042.76966. (下转 2270 页)

- [21] Chen CJ, Alqwbani M, Zhao J, et al. Effects of teriparatide versus salmon calcitonin therapy for the treatment of osteoporosis in Asia: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Endoc Metab Immune Disord Drug Targ*, 2021, 21 (5) : 932-942. DOI: 10.2174/1871530320999200817114817.
- [22] PRizwan H, Pal S, Sabnam S, et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes [J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117148. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117148.
- [23] Peng P, Nie Z, Sun F, et al. Glucocorticoids induce femoral head necrosis in rats through the ROS/JNK/c-Jun pathway [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11 (1) : 312-321. DOI: 10.1002/2211-5463.13037.
- [24] Liu M, Wu X, Cui Y, et al. Mitophagy and apoptosis mediated by ROS participate in AICl (3)-induced MC3T3-E1 cell dysfunction [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 155: 112388. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112388.
- [25] Huang L, Liu Z, Liu H, et al. Iron overload impairs bone marrow mesenchymal stromal cells from higher-risk MDS patients by regulating the ROS-related Wnt/ β -Catenin pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 8855038. DOI: 10.1155/2020/8855038.
- [26] Ma XY, Wen XX, Yang XJ, et al. Ophiopogonin D improves osteo-integration of titanium alloy implants under diabetic conditions by inhibition of ROS overproduction via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biochimie*, 2018, 152: 31-42. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.04.022.
- [27] Chen X, Yang K, Sun P, et al. Exercise improves bone formation by upregulating the Wnt3a/ β -catenin signalling pathway in type 2 diabetic mice [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2021, 13 (1) : 116. DOI: 10.1186/s13098-021-00732-6.
- [28] 陈长军, 赵鑫, 罗月, 等. 外泌体的优化策略及在促进骨修复再生中的应用研究进展 [J]. *中华骨科杂志*, 2023, 43 (24) : 1688-1694. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20230825-00122.
- Chen CJ, Zhao X, Luo Y, et al. Enhancing bone regeneration: advances and innovations in exosome engineering [J]. *Chinese Journal of Orthopaedics*, 2023, 43 (24) : 1688-1694. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20230825-00122.

(收稿:2023-12-28 修回:2024-09-26)
(同行评议专家: 郭保生, 孙国栋)
(本文编辑: 宁桦)

(上接 2263 页)

- [18] Cho JH, Choi JS, Chun SW, et al. The IL-1B genetic polymorphism is associated with aspirin-induced peptic ulcers in a Korean ethnic group [J]. *Gut Liver*, 2016, 10: 362-368. DOI: 10.5009/gnl15129.
- [19] Zheng WJ, Chen MY, Si XS, et al. Associations between interleukin-1-B gene-511G/A polymorphism and sepsis risk: A meta-analysis [J]. *Cytokine*, 2022, 157: 155953. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155953.
- [20] Kapelski P, Skibinska M, Maciukiewicz M, et al. Association study of functional polymorphisms in interleukins and interleukin receptors genes: IL-1A, IL-1B, IL-1RN, IL-6, IL-6R, IL-10, IL-10RA and TGF- β 1 in schizophrenia in Polish population [J]. *Schizophr Res*, 2015, 169 (1-3) : 1-9. DOI: 10.1016/j.schres.2015.10.008.
- [21] Smith AJP, Keen LJ, Billingham MJ, et al. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL-1R1-IL-1A-IL-1B-IL-1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis [J]. *Genes Immun*, 2004, 5: 451-460. DOI: 10.1038/sj.gene.6364107.
- [22] Zhang JH, Sun XD, Wang JM, et al. Association of the IL-1RN variable number of tandem repeat polymorphism and Helicobacter pylori infection: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0175052. DOI: 10.1371/journal.pone.0175052.

(收稿:2023-11-06 修回:2024-06-27)
(同行评议专家: 江起庭, 魏世隼, 孟庆阳, 张思成)
(本文编辑: 宁桦)