

· 临床研究 ·

白细胞介素 4 受体 Q576R 基因多态性与 支气管哮喘病人 IgE 的相关性

张爱民¹, 李海林², 郝萍², 陈燕华², 李继梅², 莫亚雄², 戴梅²

(1 湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙 410005, 2 昆明医学院第一附属医院儿科, 云南 昆明 523000)

[摘要] 目的 白细胞介素 4(IL-4)是哮喘发病机制中重要的细胞因子。该文探讨了白细胞介素 4 受体(IL-4R)基因 Q576R 多态性与儿童支气管哮喘及 IgE 水平的相关性。**方法** 用聚合酶链反应/限制性片段长度多态性分析方法(PCR/RFLP),检测 94 例哮喘儿童和 68 例正常对照儿童 IL-4R Q576R 的多态性,并用酶联免疫吸附法(ELISA)检测两组儿童血浆总 IgE 的水平,然后进行 χ^2 检验及成组 t 检验。**结果** IL-4R 杂合突变基因型 Q576R、突变等位基因 R576 的分布频率在哮喘儿童及正常对照儿童中分布频率分别为 41%、16% 及 26%、16%,差异有显著性($P < 0.01$, < 0.05);哮喘儿童中杂合突变基因型 Q576R 携带者与野生型 Q576Q 携带者比较,血浆总 IgE 水平分别为 225.78 ± 51.43 IU/mL、 163.24 ± 31.32 IU/mL,差异无显著性。**结论** IL-4R 突变等位基因 R576 可能是儿童易感哮喘的一个候选基因;未发现 IL-4R 等位基因 R576 对哮喘儿童血浆总 IgE 水平升高有明显影响;白细胞介素 4 受体 Q576R 基因多态性与支气管哮喘有相关性。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2):109-112]

[关键词] 受体, 白细胞介素 4; 哮喘; 基因; 免疫球蛋白类; 儿童

[中图分类号] R562.2⁺5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0109-04

Association of Q576R polymorphism in the interleukin-4 receptor gene with serum IgE levels in children with asthma

ZHANG Ai-Min, LI Hai-Lin, HAO Ping, CHEN Yan-Hua, LI Ji-Hai, MO Ya-Xiong, DAI Mei. Department of Pediatrics, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, China (Email: Lilly610@sina.com)

Abstract: Objective Interleukin-4 plays a key role in the development of asthma. Overseas studies have shown that Q576R polymorphism in the interleukin-4 receptor (IL-4R) gene is related to asthma as well as increased serum IgE levels. This study was designed to investigate the association of Q576R polymorphism in IL-4R gene with childhood asthma and serum IgE levels. **Methods** The polymorphism of IL-4R Q576R was determined by PCR/RFLP and serum total IgE level was measured using ELISA in 94 children with asthma. Sixty-eight healthy children served as controls. **Results** The distribution frequency of heterozygous genotype Q576R (41%) and mutant allele R576 (26%) was significantly higher in children with asthma than that of controls (16% each) ($P < 0.01$; $P < 0.05$). The total serum IgE level between patients with genotype Q576R and Q576Q was not significantly different (225.78 ± 51.43 IU/mL vs 163.24 ± 31.32 IU/mL, $P > 0.05$). **Conclusions** The mutant R576 allele of IL-4R may be one of the candidate genes for susceptibility to asthma. Allele R576 of IL-4R is related to asthma but is irrelevant to the total serum IgE level in children with asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2):109-112]

Key words: Receptor, interleukin-4; Asthma; Genes; Immunoglobulins; Child

支气管哮喘(以下简称为哮喘)是一种以慢性可逆性气道阻塞、气道炎症和气道高反应性为主要特点的疾病,其发病机制和环境及遗传因素相互作用有关。国外已广泛开展哮喘相关基因与哮喘表型(phenotype)相关性研究。白细胞介素 4(IL-4)介导 Th1/Th2 失衡、促进 B 细胞增殖、Ig 类别转换、IgE 合成、诱导 VCAM(vascular cell adhesion molecule)

表达、促肥大细胞、嗜酸性细胞在气道炎症局部浸润、脱颗粒产生炎性介质,在哮喘的发生、发展中发挥重要作用^[1,2]。IL-4 通过白细胞介素 4 受体(IL-4R)发挥生物学效应,IL-4R 由 α 链及 γ_c 链组成。IL-4R α 链(IL-4R α)在调节 IgE 的产生及哮喘的发病机制中发挥重要作用^[3]。其编码基因有 6 种错义突变致表达的氨基酸发生替换。其中 Q576R 为

[收稿日期]2005-10-08;[修回日期]2006-02-08

[作者简介]张爱民,女,硕士,主治医师。主攻方向:小儿感染、哮喘。

1902 位腺嘌呤 A 突变为鸟嘌呤 G, 导致 IL-4R 胞浆区 576 位谷氨酰胺 Gln(简称 Q)被精氨酸 Arg(简称 R)替代^[4]。国外研究^[3,4]表明 IL-4R α Q576R 多态性与哮喘及 IgE 增高有关, R576 可能是哮喘易感的候选基因。作者用多聚酶链反应/限制性片段长度多态性分析方法(PCR/RFLP), 初步研究了 IL-4R α Q576R 在哮喘儿童及正常儿童中的多态性, 并探讨了各等位基因对哮喘儿童血浆 IgE 水平的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 哮喘组 符合全国儿科哮喘防治协作组制定的《儿童哮喘防治常规》(试行)^[5]标准, 随机选择于 2002 年 6 月至 2003 年 6 月确诊的哮喘儿童 94 名。男 58 例, 女 36 例, 年龄 3~14 岁。

1.1.2 对照组 同期来院健康检查的正常儿童 68 名, 男 38 例、女 30 例, 年龄 3~13 岁。与哮喘组的年龄均值比较差异无显著性, 排除有哮喘病史、典型过敏性疾病如过敏性鼻炎、结膜炎、湿疹及一、二级亲属哮喘家族史。

1.2 方法

以 EDTA-K 抗凝血 3 mL, 离心, 留取血浆检测 IgE 水平, 白细胞提取 DNA。

1.2.1 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆总 IgE 水平 试剂盒购自天津新传生物公司, 操作按说明书进行, 标准孔采用复管。数据用中原科化实验室管理系统处理。

1.2.2 PCR-RFLP 分析 IL-4R α Q576R 参照文献^[6]设计引物, 引物为上海生物工程公司合成, 上游序列为 5'-TCG GCC CCC ACC AGT GGC GAT C-3', 下游引物序列 5'-CCA GTC CAA AGG TGA ACA AGG GG-3'。循环参数: 94℃ 1 min 变性, 67℃ 40 s 退火, 72℃ 1 min 延伸, 共 30 个循环, 72℃ 10 min 延伸, 4℃ 保存。取各 PCR 产物 1.5 μ L (约 0.5 μ g), 限制性内切酶 PVU I (大连宝生物有限公司产品) 10 U, 37℃ 酶切消化 1 h。8% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 硝酸银染色。

1.2.3 结果判读 PCR 上游引物为 IL-4R α 编码基因源序列的 1880 位-1901 位碱基序列, 其中第 1898 位碱基由 T 改为 G, 下游引物为 2147-2125 位的互补序列。PCR 扩增后, 产生了 268 bp 大小的 DNA PCR 产物。若紧接上游引物 3' 端的 1902 位鸟嘌呤 G 替代腺嘌呤 A, 用 PVU I 酶切后, 产生一个

268 bp 大小片段为野生型 Q576Q, 产生 247 bp 大小的一个片段为纯合突变型 R576R, 有 268 bp、247 bp 两个片段的为杂合型 Q576R。根据酶切结果判断为杂合突变型及纯合野生型的 PCR 产物, 随机各取一份约 40 μ L (浓度约 350 ng/ μ L), 交大连宝生物工程公司测序。

1.3 统计学分析

两组儿童 Q576、R576 等位基因频率及基因型频率比较分别用 χ^2 检验; 哮喘组与对照组儿童血浆总 IgE 水平比较、哮喘儿童中基因型 Q576Q、Q576R 携带者血浆总 IgE 水平比较分别用 *t* 检验。以上统计学分析采用 SPSS10.0 计算机统计学软件处理。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 产物经 Pvu I 酶切后电泳、硝酸银染色

图 1 中 1, 2, 6 泳道为阳性突变基因型, 3, 4, 5, 7 泳道为野生基因型。

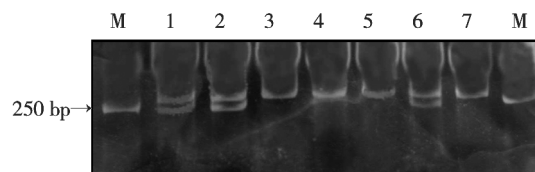


图 1 PCR 产物 Pvu I 酶切后 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图。M: DNA 分子量标记 DL2000, 1, 2, 6 泳道出现 247 bp、268 bp 的两条带, 为杂合突变型 Q576R, 3, 4, 5, 7 泳道只有 268 bp 的一条带, 为野生型 Q576Q, 21 bp 的 DNA 产物已出胶, 本实验中未发现有纯合突变型 R576R。

2.2 基因型 Q576Q、Q576R 携带者 PCR 产物基因测序

Q576Q 型采用反向克隆测序, 所测样本的基因型为野生型 Q576Q; Q576R 型采用反向测序, 该样本的基因型为复合 Q576R 型。从测序结果看, 充分证明 PCR 扩增结果及确切结果可靠。见图 2, 3。

2.3 哮喘及对照组儿童基因型和等位基因分布频率比较

两组 Q576 基因分布频率分别为 41%, 16%, 两组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.4 哮喘儿童中杂合突变型 Q576R 携带者、野生型 Q576Q 携带者血浆总 IgE 水平

两者血浆 IgE 水平比较差异无显著性, $P > 0.05$ 。见表 2。

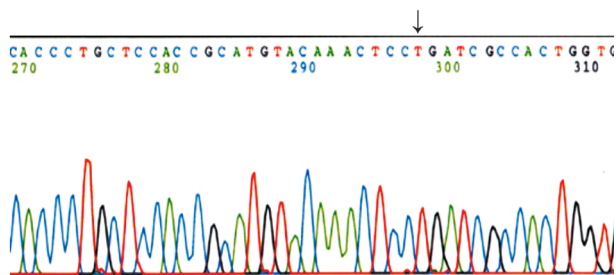


图2 Q576Q的PCR产物反向克隆测序图。Q576Q型采用反向克隆测序,298位为IL-4R α 编码基因1902位。此测序结果为T,互补碱基为A。此样本的基因型为野生型Q576Q。

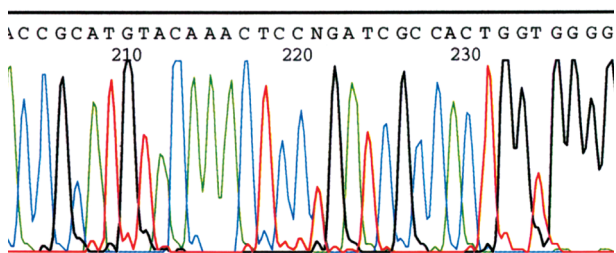


图3 Q576R型PCR产物反向测序图。Q576R型采用反向测序,第221位碱基为C和T的套峰(其互补碱基分别为G,A),说明此样本的基因型为杂合Q576R型。

表1 哮喘组、对照组儿童基因型及等位基因分布频率表
例(%)

组别	例数	基因型频率 ^a		等位基因频率 ^b	
		Q576R	Q576Q	R576	Q576
对照组	68	11 (16)	57 (84)	11 (16)	125 (84)
哮喘组	94	39 (41)	55 (59)	39 (21)	149 (79)

a $\chi^2 = 11.848, P < 0.01, OR = 3.6$; b $\chi^2 = 9.686, P < 0.05$

表2 哮喘儿童中基因型Q576R、Q576Q携带者的
血浆IgE水平比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血浆IgE水平(IU/mL)
Q576R型携带者	39	225.78 $\pm$ 51.43
Q576Q型携带者	55	163.24 $\pm$ 31.32

3 讨论

白细胞介素4是哮喘发病机制中重要的细胞因子。国外研究表明IL-4R α Q576R多态性与哮喘及IgE增高有关,R576可能是哮喘易感的候选基因^[4,7-9]。

本研究表明杂合突变基因型Q576R在哮喘儿童及正常对照儿童中分布频率差异有显著性OR = 3.6。携带突变基因型Q576R的儿童患哮喘的危险度是野生型Q576Q携带者的3.6倍。R576与儿童哮喘易感有关,R576可能是儿童哮喘易感的一个候选基因。对携带有突变等位基因R576的哮喘高危

人群进行早干预,有可能早期防止哮喘的发生、发展。

R576是与哮喘、过敏症有相关关系的分子机制,研究认为^[10,11]:R576上调了IL-4 α 信号传导,使靶细胞如T,B淋巴细胞对IL-4的反应增强,IL-4的生物学活性增加,有可能使哮喘易于发生发展。

哮喘病人中杂合突变基因型Q576R携带者、纯合野生基因型Q576Q携带者血浆总IgE均值差异无显著性。故没有发现R576对哮喘儿童总IgE水平增高有影响。本研究结果与Grimbacher^[12]的研究结果相同。

R576与血浆总IgE水平相关性的结论不一致,主要的可能原因是IL-4与B淋巴细胞膜上的IL-4R结合,介导IgE生成;IgE与Mc,Bas膜上IgE高亲和力受体Fc ϵ RI β 结合。当过敏原再次进入人体,致Mc,Bas脱颗粒,气道炎症及气道高反应性发生。因此,IL-4通过IL-4R α 的信号传导,对调节IgE的生成有重要作用。但是哮喘病人IgE水平受细胞因子及多个基因多态性影响,研究表明位于5q31的IL-4基因^[13]、11q13的Fc ϵ RI β 基因^[14]、16p12的IL-4R α 基因^[15]的多态性均与哮喘病人IgE增高有关。另外哮喘是复杂的多基因遗传疾病。而且遗传性状的形成还与环境因素有关^[16]。单个基因多态性孤立地只能产生较小的功能性影响,可能需要与其他基因多态性共同起作用,才能导致功能性状的显著改变^[7]。Sandford^[9]研究表明,IL-4R α R576等位基因与致死性或近致死性(fatal or near-fatal)哮喘没有相关性,但与IL-4启动子多态性等位基因-589T联合,构成等位基因型R576/-589T,则发现R576/-589T与致死性或近致死性哮喘有相关关系。Risma^[17]对哮喘病人IL-4R α 基因多态性研究发现,R576单独发生时,R576与哮喘无相关关系,但当V50同时发生构成基因型R576/V50,则发现R576/V50与哮喘有相关关系。等位基因R576对IgE升高这一临床表型来说,为微效基因。单一等位基因突变,可能不足以对总IgE升高造成显著影响^[18]。所以Hall^[18]提出,对IL-4及IL-4R α 的基因多态性进行联合检测,能更好地发现与哮喘表型如严重气流阻力、高IgE水平等有关的候选基因。由于遗传异质性不同,R576在人群中的分布频率可不相同,对哮喘临床表型如总IgE水平的影响亦可能不同^[19,20]。

总之,本研究认为杂合突变基因型Q576R、突变等位基因R576在哮喘儿童及正常对照儿童中的分布频率差异有显著性,R576可能是儿童哮喘易感的一个候选基因。但没有发现R576对哮喘儿童血

浆总 IgE 水平升高有显著影响。可能原因是影响哮喘病人总 IgE 水平的因素较多、微效基因效应、遗传异质性影响。将来有待扩大样本量,进一步研究 Q576R 多态性与哮喘表型的相关性。

[参 考 文 献]

- [1] 卢巍. 白介素 4 与支气管哮喘. 国外医学呼吸系统分册[J]. 2001,21(3):125-129.
- [2] Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists[J]. Respir Res, 2001,2(2):66-70.
- [3] Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling[J]. Immunol Today, 2000,21(2):60-64.
- [4] Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the α subunit of the interleukin-4 receptor[J]. N Engl J Med, 1997, 337(24):1720-1725.
- [5] 全国儿科哮喘防治协作组. 儿童哮喘防治常规(试行)[J]. 中华儿科杂志, 1998,12(12):747-751.
- [6] Aithal GP, Day CP, Leathert J, Daly AK, Hudson M. Association of single nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population[J]. Genes Immun, 2001,2(1):44-47.
- [7] Rosa-Rosa L, Zimmermann N, Bernstein JA, Rothenberg ME, Hershey GK. The 576R IL-4 receptor α allele correlates with asthma severity[J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 104(5):1008-1014.
- [8] Wjst M, Kruse S, Illig T, Deichmann K. Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants[J]. Eur J Immunogenet, 2002,29(3):263-268.
- [9] Sandford A, Chagani T, Zhu S, Weri TD, Bai TR, Spinelli JJ, et al. Polymorphisms in the IL-4, IL-4RA and FCER1B genes and asthma severity[J]. J Allergy Clin Immunoc, 2000,106(1):135-140.
- [10] Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, et al. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor α -chain in IgE synthesis[J]. J Immunol, 1996, 162(3):1227-1231.
- [11] 李光, 赵育莹, 曲书强, 逮晓辉, 刘晨, 唐建民, 等. 支气管哮喘模型大鼠 IL-4 IL-10, IFN- γ 的检测[J]. 中国当代儿科杂志, 2004,6(6):474-476.
- [12] Grimbacher B, Holland SM, Puck JM. The interleukin-4 receptor variant Q675R in hyper-IgE syndrome[J]. N Engl J Med, 1998, 338(15):1073-1074.
- [13] Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations[J]. Science, 1994,264(5162):1152-1155.
- [14] Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y. A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000,161(3 Pt 1):906-909.
- [15] Deichmann KA, Heinzann A, Forster J. Linkage and allelic association of atopy and marker flanking the IL-4 receptor gene[J]. Clin Exp Allergy, 1998,28(2):151-155.
- [16] 陈竺. 医学遗传学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001, 83-85.
- [17] Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Erickson MB, Bernstein JA, et al. V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function[J]. J Immunol, 2002,169(3):1604-1610.
- [18] Hall IP. Interleukin-4 receptor alpha gene variants and allergic disease[J]. Respir Res, 2000,1(1):6-8.
- [19] Tan EC, Lee BW, Tay AW, Shek L, Chew FT, Tay AH. Interleukin-4 receptor variant Q576R: ethnic differences and association with atopy[J]. Clin Genet, 1999,56(4):333-334.
- [20] 董蔚, 盛军, 浦燕艳, 石学耕, 史桔英. 哮喘患儿细胞内 IL-4 INF- γ 和血清 IgE 测定及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2002,4(2):119-120.

(本文编辑:吉耕中)