

· 临床研究 ·

哮喘儿童 IgE 高亲合力受体 β 链基因多态性的初步研究

李敏¹, 杜琼², 李兰¹, 宋丽¹, 李波¹

(四川省医学科学院, 四川省人民医院, 1. 儿科; 2. 检验科, 四川 成都 610072)

【摘要】目的 探讨 IgE 高亲合力受体 β 链基因的 I181L, V183L 和 E237G 位点基因多态性与儿童哮喘及血浆总 IgE 的关系。**方法** 采用扩增阻滞突变系统聚合酶链式反应 (ARMS-PCR) 检测技术对 50 例四川地区哮喘儿童和 40 例健康对照儿童进行 181, 183, 237 三个位点的多态性进行检测, 并用双抗体夹心 ELISA 法检测血清总 IgE 水平, 分析其与儿童哮喘易感性的关系。**结果** 在哮喘儿童中检测到 I181L 突变 5 例、V183L 突变 2 例、E237G 突变 7 例, 在对照组中未发现突变子; 有突变的哮喘儿童的血清 IgE 明显高于无突变和正常对照儿童。I181L 和 E237G 突变与儿童哮喘和血清 IgE 升高有显著相关性。**结论** Fc ϵ R1 β 基因 I181L 和 E237G 基因多态性是儿童哮喘发病的重要候选基因, 与血清总 IgE 水平升高密切相关。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8 (6): 453-456]

【关键词】 哮喘; IgE 高亲合力受体; 突变; 儿童

【中图分类号】 R562.2⁺5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2006)06-0453-04

Gene mutation of high affinity immunoglobulin E receptor β -chain in children with asthma

LI Min, DU Qiong, LI Lan, SONG Li, LI Bo. Department of Pediatrics, Sichuan Province People's Hospital, Chengdu 610072, China (Email: Lmcsy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To investigate the association of the polymorphism of I181L, V183L and E237G in the high affinity immunoglobulin E receptor β -chain (Fc ϵ R1 β) with the susceptibility of childhood asthma and the serum total immunoglobulin E (IgE) level. **Methods** The coding variants of I181L, V183L and E237G and the serum total IgE level were detected using amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) and double antibody sandwich ELISA respectively in 50 asthmatic children and 40 normal controls from Sichuan Province. The association of gene mutation with the susceptibility of asthma and the serum total IgE level was analyzed. **Results** There were 5 cases of I181L mutation, 2 of V183L mutation, and 7 of E237G mutation in the Asthmatic group. There was no mutation in the Normal control group. The frequency of I181L and E237G mutation in the Asthmatic group were statistically higher than in the Normal control group ($P < 0.01$). The serum total IgE level in the Asthmatic subgroup with I181L mutation (2.837 ± 0.407) or E237G mutation (3.044 ± 0.419) was significantly higher than in the Asthmatic subgroup without gene mutation (2.156 ± 0.638) and the Normal control group (1.348 ± 1.291) ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusions** The polymorphism of Fc ϵ R1 β I181L and E237G is a susceptible gene of childhood asthma and closely associates with the increased serum total IgE level. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (6): 453-456]

Key words: Asthma; High affinity IgE receptor; Mutation; Child

近年来研究证实, 支气管哮喘是一种多基因遗传性疾病, 特应性素质在哮喘发病中占据重要地位, 而 IgE 是反映哮喘病人特应性素质的主要指标。定位于 11q13 染色体上的免疫球蛋白 E 高亲合力受体 β 链 (Fc ϵ R1 β) 基因被认为是哮喘发病的主要候选基因之一, 也是 IgE 产生的主要调节基因^[1]。本实验采用扩增阻滞突变系统聚合酶链式反应 (ARMS-PCR) 检测方法对该基因的多个位点进行了研究, 旨在探讨 Fc ϵ R1 β 基因与四川地区儿童哮喘的易感性

和特应性的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

哮喘组: 按照统一的诊断标准^[2], 50 例哮喘儿童均为 2002 年 10 月至 2005 年 8 月在本院门诊就诊及住院的儿童, 年龄 1 岁 3 月至 14 岁, 平均年龄 5.7 岁, 男 32 例, 女 18 例。健康对照组: 从本院儿

[收稿日期] 2006-04-30; [修回日期] 2006-06-24

[作者简介] 李敏, 女, 主任医师。主攻方向: 小儿呼吸系统疾病。

保和体检中心随机选择 40 例无过敏性疾病的健康儿童,年龄 2~14 岁,男 25 例,女 15 例。要求两组研究对象的父母必须是四川人且患儿在四川出生成长。

1.2 扩增引物

扩增引物序列^[3,4]由北京赛百盛基因公司合成,基因组数据库编号 M8796。

1.3 实验方法

1.3.1 外周血 DNA 提取 取静脉血 3 mL,用 2% EDTA 抗凝,用淋巴细胞分离液分离白细胞,用北京赛百盛公司的 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA(按说明书操作)。

1.3.2 基因组 DNA 的扩增 每个标本设 7 管,其中 I181L3 管,V183L1 管,E237G3 管,分别加入相应的引物。PCR 扩增体系:10 × PCR 缓冲液 5 μL, Taq 聚合酶 3U,10 mmol/L dNTPs 2 μL,10 μmol/L 引物 1 μL,DNA 模板 2 μL,最后加双蒸水至总体积 50 μL。PCR 热循环条件:I181 L 和 V183 L 实验管为 94℃ 变性 5 min→94℃ 50 s, 58℃ 45 s, 72℃ 50 s,循环 35 次→72℃ 10 min;E237G 实验管为 94℃ 变性 5 min→94℃ 50 s, 55℃ 45 s, 72℃ 50 s,循环 35 次→72℃ 10 min。

1.3.3 扩增后产物分析 取 10 μL PCR 扩增产物,加入 3 μL 加样缓冲液,混匀后加样于含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳(DNA 分子量 Marker 为 50,150,300,500,800 和 1 000 bp),在 80 V 下电泳 30 min,在美国 BIO RAD T2A 凝胶成像仪观察并摄像。

1.3.4 血清总 IgE 水平测定 同时取静脉血 2 mL 分离血清,采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清总 IgE 水平。

1.4 统计学方法

哮喘组与对照组基因突变频率的对比分析用 χ^2 检验。将血清总 IgE 水平取对数转换成 Log IgE 水平,使数据呈对称分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 ARSM-PCR 法测 I181L,V183L,E237G 位点

2.1.1 I181L 位点 不同的引物分别扩增出正常序列和突变序列 DNA 区带(图 1),其中 159 bp 片段是未突变的 181,而 214 bp 片段是突变后的 181。哮喘组中检测到 5 例 181 突变,对照组未检测出 181 突变。

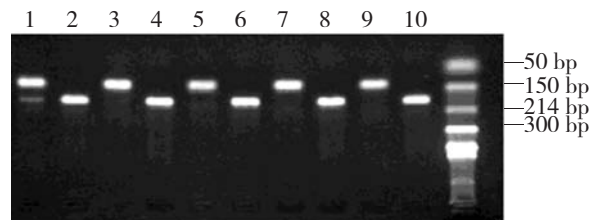


图 1 FcεR1β 基因 181 位点 DNA 片段的琼脂凝胶电泳图谱。1,3,5,7,9 为未突变的 181;2,4,6,8,10 为突变后的 181DNA 片段。

2.1.2 V183L 位点 不同的引物分别扩增出正常序列和突变序列 DNA 区带(图 2),其中 209 bp 片段是突变后的 183。哮喘组中检测到 2 例 183 突变,对照组未检测出 183 突变。

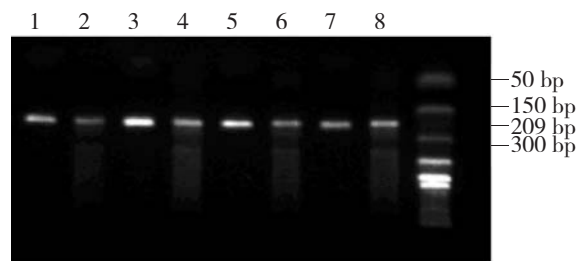


图 2 FcεR1β 基因 183 位点 DNA 片段的琼脂凝胶电泳图谱。1~8 片段为突变后的 183 位点 DNA 片段。

2.1.3 E237G 位点 不同的引物分别扩增出正常序列和突变序列 DNA 区带(图 3),其中 238 bp 片段是突变后的 237。哮喘组中检测到 7 例 237 突变,对照组未检测出 237 突变。

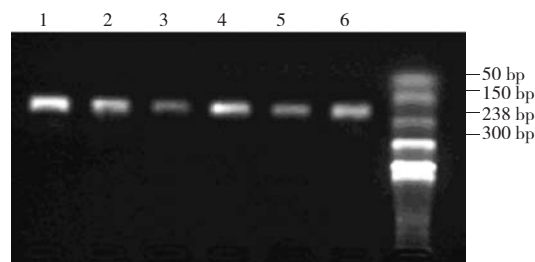


图 3 FcεR1β 基因 237 位点 DNA 片段的琼脂凝胶电泳图谱。1~6 片段为突变后的 237 位点 DNA 片段。

2.2 FcεR1β 基因三位点突变频率与哮喘相关性分析

在 50 例哮喘儿童中分别检测到 5 例 I181L 突变,2 例 V183L 突变及 7 例 E237G 突变,而在对照组儿童中未检测出三位点突变,经 χ^2 检验显示,哮

喘组和对照组比较总的突变频率差异有显著性;而在 I181L, E237G 位点两组突变频率差异有显著性、在 V183L 位点两组突变频率差异无显著性(见表 1),说明哮喘儿童发病与基因突变相关;I181L, E237G 位点突变与四川地区儿童哮喘可能存在相关性, V183L 位点突变率较低。

表 1 I181L, V183L, E237G 位点突变频率与哮喘的关系

	I181L	V183L	E237G	无突变
对照组	0	0	0	40
哮喘组	5 ^a	2	7 ^a	36

a 与对照组比较, χ^2 值分别为 25.4; 42.77, $P < 0.01$

2.3 FcεR1β 基因三位点突变频率与血清 IgE 关系分析

为使数据呈对称分布,将通过双抗体夹心 ELISA 法检测出的血清总 IgE 水平取对数转换成 Log IgE 水平。存在三位点基因突变的 14 例哮喘儿童 Log IgE 水平为 2.91 ± 0.479 , 分别与无基因突变的 36 例哮喘儿童 Log IgE 水平 2.156 ± 0.638 和正常对照儿童 Log IgE 水平 1.348 ± 1.291 比较, $t = 3.989, 4.975, P < 0.01$ 差异有显著性。进一步分析发现: FcεR1β 基因 I181L 和 E237G 位点突变的哮喘儿童血清 Log IgE 水平分别与无突变的哮喘儿童和正常对照儿童比较差异有显著性(见表 2)。

表 2 FcεR1β 不同基因型对 Log IgE 的影响

	例数	Log IgE 水平($\bar{x} \pm s$)
对照组	40	1.348 ± 1.291
哮喘组 I181L	5	2.837 ± 0.407^a
V183L	2	2.621 ± 0.944
E237G	7	3.044 ± 0.419^b
无突变	36	2.156 ± 0.638

a 与无突变和对照组比较, $t = 2.3, 2.866, P < 0.05$; b 与无突变和对照组比较, $t = 3.51, 3.872, P < 0.01$

3 讨论

I 型变态反应发生的关键步骤是 IgE 与其效应细胞上的 IgE 高亲和力受体结合,而 IgE 高亲和力受体主要分布于肥大细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、嗜碱性细胞和树突状细胞上,是一个由 α, β 和 $\gamma 3$ 种亚单位组成的异型多聚复合物,有 7 个外显子和 6 个内含子。近年来国外多项研究发现,在 FcεR1β 上的 6 号外显子的 181, 183 位点和 7 号外显子的 237 位点的基因突变与哮喘易感性、IgE 水平增高和气道反应性呈显著相关^[4~6],由于 181 位

点的异亮氨酸被亮氨酸取代、183 位点的缬氨酸变为亮氨酸及 237 位点的氨基酸由谷氨酸变成了甘氨酸,使受体对配体的敏感性增高,从而影响了 FcεR1β 的细胞内信号的传导功能,激发靶细胞呈现一系列反应,释放炎症介质产生速发型变态反应,出现临床症状。Shirakawa 等^[5]报道英国人在 FcεR1β 基因的 I181L 位点突变与特应性有明显相关性,且与哮喘的母系遗传有关;Samantha 等^[3]在 48 例哮喘儿中发现 V183L 位点的突变率仅 2%,认为与哮喘不存在相关性;Hill^[4]和 Shirakawa 等^[6]在对澳大利亚和日本人的研究中发现 FcεR1β 基因第 7 号外显子的 E237G 位点突变与哮喘易感性相关;国内赵凯殊等^[7]报道 I181L 位点突变是长春地区儿童哮喘的易感基因, V183L 和 E237G 位点突变与小儿哮喘无关;而汤彦等^[8]对 60 例哮喘患者的研究中提示 I181L 和 V183L 的突变在中国南方汉族人群中的突变率极低不适于作基因多态性研究, E237G 的突变是哮喘或特应症的相关基因。总之,在国内外的诸多报道中,由于所选择病例、人种、遗传异质性及研究方法等因素不同,得出的研究结果不尽相同。本实验结果表明, I181L 和 E237G 位点基因突变频率与正常对照组存在显著性差异, V183L 位点突变与对照组无差异,提示 FcεR1β 基因的 I181L 和 E237G 位点突变可能是四川地区儿童哮喘的易感基因。但是由于哮喘为多基因遗传性疾病,由位于不同染色体上成对致病基因共同作用引起^[9],而且发病与否受环境因素的影响相当大,因此,对本研究中未发现基因突变的病例有必要进行进一步的研究。

人血清中高水平的 IgE 是哮喘等过敏性疾病的一个标志, IgE 的含量与气道反应性呈线性关系。在正常人血清中 IgE 含量甚微,但当 FcεR1β 基因在编码区的某些位点发生突变导致氨基酸序列改变,可增加受体的细胞内信号传递能力,促使肥大细胞释放 IL-4, 5 等细胞因子,刺激高水平的 IgE 合成,而 IgE 水平的增加反过来又可刺激细胞表面 FcεR1 受体的表达,使 IgE 进一步升高^[10]。本实验研究发现,具有 FcεR1β 基因 I181L, V183L 和 E237G 三位点突变的儿童哮喘患者,其血清总 IgE 水平明显高于没有基因突变的儿童哮喘患者和正常对照儿童,尤其是 I181L 和 E237G 两位点突变的哮喘患者分别与无突变的哮喘患者和正常对照比较,血清总 IgE 水平明显升高,差异具有显著性,与赵凯殊等^[7]的报道不同,说明 FcεR1β 基因多态性可能与四川地区哮喘儿童高 IgE 水平密切相关。

本研究表明 FcεR1β 基因 I181L 和 E237G 基因

多态性是儿童哮喘发病的重要候选基因,与血清总IgE水平升高密切相关。因本组样本数量有限,目前正在扩大样本量作更全面的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Anderson GG, Cookson WO. Recent advances in the genetics of allergy and asthma [J]. Mol Med Today, 1999, 5(6): 264-273.
- [2] 全国儿科哮喘防治协作组. 儿童哮喘防治常规 [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(2): 100-106.
- [3] Green SL, Gaillard MC, Song E, Dewar JB, Halkas A. Polymorphisms of the Beta Chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεR1βE237G) in South African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(5 Pt 1): 1487-1492.
- [4] Hill MR, Cookson WO. A new variant of the βsubunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεR1βE237G); association with measure of atopy and bronchial hyperresponsiveness [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(7): 959-962.
- [5] Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AW, Faux JA, et al. Association between atopy and variants of the β subunit of the high affinity IgE receptor [J]. Nat Genet, 1994, 7(2): 125-129.
- [6] Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, et al. Association between atopic asthma and a coding variant of FcεR1β in a Japanese population [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(12): 2068.
- [7] 赵凯妹, 成焕吉, 乔红梅, 赵芳兴, 孙明远, 付文永. 儿童哮喘IgE高亲合力受体β链基因多态性分析 [J]. 临床儿科杂志, 2004, 22(12): 794-797.
- [8] 汤彦, 吴晓琴, 刘晓妍, 曾艺, 李月琴, 吴钊, 等. 高亲合度IgE受体β链基因多态性与过敏性哮喘相关性的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(9): 6-10.
- [9] 戴家熊, 韩连书. 小儿哮喘 [M]. 上海科技文献出版社, 1998: 13-17.
- [10] 唐昊. IgE与其高亲合力受体FcεR1的相互作用 [J]. 免疫学杂志, 2005, 21(3): 57-59.

(本文编辑: 吉耕中)

· 消息 ·

全军第十届儿科专业学术年会暨第三次全国儿科热点研讨会 征文通知

由全军儿科专业学会主办的全军第十届儿科专业学术年会、以及由全军儿科专业学会与中国当代儿科杂志合作主办的第三次全国儿科热点研讨会拟定于2007年8月在内蒙古自治区首府呼和浩特市召开。要求军内儿科以及相关专业的专业工作者投稿、参会,同时欢迎军外各单位儿科以及相关专业的专业工作者踊跃投稿、参会交流。征集论文内容包括儿科学及其相关专业各领域临床、科研、教学、护理和学科建设的学术成果、经验总结以及前沿进展。请将论文全文并附800至1000字摘要发Email到:zhjfengzc@126.com;如欲以纸质稿件形式投稿,请按以上篇幅要求打印好稿件并录入3.5'软盘一并寄北京市东城区朝内北小街2号北京军区总医院儿科研究所孔祥永收(邮编100700),联系电话010-66721787。地方参会者也可将征文发到中国当代儿科杂志编辑部,地址:湖南长沙市湘雅路87号中国当代儿科杂志社,邮编410008。Email:ddek7402@163.com。投稿主题注明“会议征文”字样。截稿日期为2007年5月31日。

全军儿科专业学会
中国当代儿科杂志编辑部
2006年10月15日