

论著·临床研究

TIM-4 基因多态性与儿童哮喘的关系

陈建平¹ 赵婉莹² 何念海¹ 和水祥² 王刚¹ 汪万军¹

(1. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 400038;

2. 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的 探讨哮喘免疫调节基因 Tim-4 启动子区和内含子区多态性与中国西南地区儿童变应性哮喘的遗传易感性的关联。方法 选取哮喘组儿童 579 例, 平均年龄 7.2 岁; 对照组儿童 524 例, 平均年龄 7.6 岁。研究 TIM-4 基因启动子区的 RS6882076 和内含子区 RS4704727 两个位点, 采用 PCR-RFLP 检测所有研究对象的两个多态性位点的基因型, 进行病例对照研究分析。结果 PCR-RFLP 检测结果显示, TIM-4 基因启动子区的 RS6882076 和内含子区 RS4704727 这两个多态性位点在检测人群中均存在。哮喘组和对照组 RS4704727 位点基因型分布频率差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 哮喘组 RS4704727 位点单核苷酸多态性的 T 等位基因比例明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($OR = 1.603$; 95% CI 1.304 ~ 1.971; $P < 0.01$)。RS6882076 位点基因型及等位基因分布频率在哮喘组和对照组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 TIM-4 基因内含子区 RS4704727 位点与儿童变应性哮喘易感性相关, 为中国西南地区儿童哮喘的发病机制研究提供了参考。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(2): 120-123]

[关键词] 哮喘; 单核苷酸多态性; TIM-4; 儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)02-0120-04

Relationship between TIM-4 polymorphism and childhood asthma

CHEN Jian-Ping, ZHAO Wan-Ying, HE Nian-Hai, HE Shui-Xiang, WANG Gang, WANG Wan-Jun. Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038 China (He N-H, Email: henianhai@vip.sina.com)

Abstract: Objective To elucidate whether the polymorphism of asthma immune regulator gene TIM-4 is associated with the risk of childhood allergic asthma in the southwest region of China. **Methods** TIM-4 gene promoter region RS6882076 and intron RS4704727 were studied. PCR-RFLP was used to test the genotypes of two polymorphism loci among 579 cases (average 7.2 years old) of asthma and 524 controls (average 7.6 years old) in a case-control study. **Results** There were significant differences in the frequency of gene types at RS4704727 site between the asthma and the control groups ($P < 0.01$). The results of PCR-RFLP showed that the polymorphisms of RS6882076 and RS4704727 in TIM-4 gene were present in this study population. The frequency of T allele at the RS4704727 site in the asthma group was significantly lower than that in the control group ($OR = 1.603$; 95% CI 1.304-1.971; $P < 0.01$). There were no significant differences in the frequencies of gene types and allele at RS6882076 site between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** RS4704727 polymorphism of TIM-4 gene may be associated with childhood asthma, providing a better understanding of the pathogenesis of childhood asthma in the Southwest region of China.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(2): 120-123]

Key words: Asthma; Single nucleotide polymorphism; TIM-4; Child

哮喘是儿童时期最常见的慢性呼吸道变应性疾病, 近些年来儿童哮喘在全球范围有逐渐增加的趋势^[1-2], 2003 年我国城区儿童哮喘患病率调查显示: 全国儿童哮喘平均累计患病率是 1.92%, 其中重庆累计患病率最高 (4.63%)^[3]。儿童哮喘病因既受

环境因素的影响, 又有明显的遗传倾向, 是一种复杂的多因子多基因遗传病^[4]。McIntire 等^[5] 在小鼠 11 号染色体上确定了一个可以调节 T 细胞和气道表型的基因座 Tapr (T cell and airway phenotype regulator), 并在这一座位上发现了一个新的 TIM (T cell

[收稿日期] 2011-09-20; [修回日期] 2011-10-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 30600686; 重庆市自然科学基金 (CSTC, 2007BB5062)。

[作者简介] 陈建平, 男, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 何念海, 教授。

immunoglobulin domain and mucin domain) 基因家族,人类 TIM 基因家族包括:TIM-1、TIM-3、TIM-4。TIM 基因家族有调节 Th1 和 Th2 细胞介导的免疫应答的作用,TIM 基因家族在哮喘等变态反应性疾病和自身免疫性疾病的发生发展中起到至关重要的作用^[6],TIM-4 是 TIM-1 的天然配体,专一地表达在巨噬细胞、树突状细胞等抗原提呈细胞表面,与 TIM-1 结合后刺激 Th2 细胞的增值和分化^[7-9]。TIM-4 基因是最新发现的一个 TIM 基因家族成员,Nakajima 等^[10]在对美国黑人、高加索人、日本人的研究中报道了 TIM-4 基因存在多态性,但未对这些单核苷酸多态性与哮喘的相关性进行研究。TIM-4 基因作为一个新发现基因,国内有关其基因多态性与哮喘的研究较少,本研究选取 TIM-4 基因启动子区的 RS6882076 和内含子区 RS4704727 两个位点,研究其与儿童哮喘的易感性和表型之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象为 2~15 岁的儿童,均来自中国西南地区,其中无血缘关系并就诊于解放军第三军医大学西南医院儿科门诊的哮喘患儿 579 例作为哮喘组(女孩 226 例,男孩 353 例),平均年龄 7.2 岁;无哮喘等变应性疾病的健康儿童 524 例作为对照组(女孩 304 例,男孩 220 例),平均年龄 7.6 岁。儿童哮喘诊断标准参照儿童支气管哮喘防治常规(试行)^[11],同时还必须满足以下两个临床指标:(1)3 次或以上肺部体查有哮鸣音或临床出现喘息、气短、胸闷的发作史。(2)使用平喘药物(支气管扩张剂)可使喘息症状减轻或缓解。对照组儿童来自同时期、同地区我科门诊、住院患儿、或幼儿园、小学体检儿童。选择标准如下:(1)无哮喘及其他变应性疾病史;(2)排除伴有其他慢性疾病。本研究获得儿童家长的知情同意及解放军第三军医大学医学伦理委员会的批准。

哮喘组患儿皮肤变应原点刺试验、血清总 IgE 和嗜酸性粒细胞(EOS)检测至少有 1 项是阳性,对照组儿童 3 项均阴性。皮肤变应原点刺试验采用标准阿罗格变应原皮试点刺试剂盒,可检测重庆地区常见 14 种变应原,包括吸入性变应原:粉尘螨、屋尘螨、棉絮、狗毛、猫毛、蟑螂、法国梧桐、葎草花粉、香烟;摄入性变应原:鸡蛋黄、鸡蛋清、海蟹、牛肉、牛奶。组胺作阳性对照液,生理盐水作阴性对照液。至少 1 种变应原呈阳性就认为皮肤点刺试验阳性。

采用酶联免疫吸附试验 ELISA 法(美国 BIO-CHECK)进行总 IgE 检测。外周血 EOS 计数采用 Sysmex XS-800i 全自动血液分析仪检测。本研究分别以总 IgE 100 IU/mL,外周血 EOS 300×10^6 个/L 作为区分正常和异常的临界值。

1.2 基因分型

基因组 DNA 提取采用试剂盒(Omega, USA) E. Z. N. A. TMSE Blood DNA Kit(D3471-02)。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法对 TIM-4 基因启动子 RS6882076 和内含子 RS4704727 两个多态性位点进行分析。DNA 扩增选择高保真 KOD-plus-201 聚合酶(TOYOBO Japan)在 PCR 扩增仪(Bio-Rad USA)上进行。启动子 RS6882076 和内含子 RS4704727 两个位点的引物设计参考文献^[12],由上海英俊生物公司合成。PCR 反应体系 50 μ L,包括 50 ng 的 DNA 模板,0.2 mM 的 dNTPs,0.2 μ M 各个引物,1 mM $MgSO_4$,10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L和 1 U 的 KOD-plus-DNA 聚合酶。PCR 循环情况包括 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,RS6882076 和 RS4704727 退火温度分别是 58 $^{\circ}$ C 和 58.5 $^{\circ}$ C,30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。采用特异性限制性内切酶(Dde I Promega USA, BseN I Fermentas USA)对 RS6882076 位点和 RS4704727 位点进行酶切,产物采用含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后在 Gel-2000 型凝胶成像仪(Bio-Rad USA)上进行分析。

1.3 统计学分析

利用在线 Arlequin 软件基于拟合优度 χ^2 检验对病例组和对照组进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。通过 Fisher χ^2 检验(SPSS 13.0)来区分哮喘组和对照组的等位基因和基因型之间的统计学差异,并分析哮喘遗传多态性的风险比值比(OR)和 95% 可信区间(CI)。采用在线 SHEsis 软件进行两两 SNP 位点的连锁不平衡分析并构建单体型进行病例对照研究。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

哮喘组和对照组两个位点的等位基因和基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡检验($P > 0.05$)。哮喘组和对照组 RS4704727 位点基因型分布频率差异有统计学意义($P < 0.001$),两组间 RS6882076 位点基因型分布频率差异无统计学意义($P = 0.169$),见表 1。哮喘组 RS4704727 位点单核苷酸多态性的 T 等位基因频率明显低于对照组,差异有统计学意

义($P<0.001$),RS6882076 位点 A 等位基因的频率与对照组相比差异无统计学意义($P=0.381$),见表 2。哮喘患儿携带 T 等位基因与 G 等位基因相比存在风险($OR=1.603$;95% CI 1.304~1.971)。

此外,TIM-4 基因启动子区 RS6882076 位点与

其内含子区 RS4704727 位点存在较虚弱的连锁不平衡($r^2=0.231$),两个位点构建的频率大于 5% 的单体型分析,A-G、A-T 和 G-T 单体型在两组中差异有统计学意义($P<0.05$),G-G 单体型在哮喘组与对照组中差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 1 TIM-4 基因两种多态性位点在对照组和哮喘组基因型的分布 [例(%)]

组别	例数	RS6882076			RS4704727		
		G/G	G/A	A/A	G/G	G/T	T/T
对照组	524	264(50.4)	205(39.1)	55(10.5)	285(54.4)	214(40.8)	25(4.8)
哮喘组	579	265(45.8)	259(44.7)	55(9.5)	396(68.4)	165(28.5)	18(3.1)
χ^2 值		3.553			22.882		
OR 值(95% CI)		1.000	0.795(0.619~1.020)	1.004(0.666~1.514)	1.000	1.802(1.398~2.323)	1.930(1.033~3.604)
P 值		0.169			<0.001		

表 2 TIM-4 基因两种多态性位点在对照组和哮喘组等位基因的分布 [例(%)]

组别	例数	RS6882076		RS4704727	
		G	A	G	T
对照组	524	733(69.9)	315(30.1)	784(74.8)	264(25.2)
哮喘组	579	789(68.1)	369(31.9)	957(82.6)	201(17.4)
χ^2 值		0.841		20.292	
OR 值(95% CI)	1.000	0.919(0.76~1.101)		1.000	1.603(1.304~1.971)
P 值		0.381		<0.001	

表 3 TIM-4 基因两个位点构成的单体型在对照组和哮喘组的分布 [例(%)]

组别	例数	单体型*			
		A-G	A-T	G-G	G-T
对照组	524	63(11.9)	94(18.1)	330(62.9)	37(7.1)
哮喘组	579	98(16.9)	87(14.9)	380(65.7)	14(2.4)
χ^2 值		11.05	4.07	1.93	26.89
OR 值(95% CI)	1.504(1.181~1.916)	0.793(0.633~0.993)	1.132(0.950~1.347)	0.326(0.209~0.508)	
P 值		0.001	0.044	0.165	<0.001

注: * 单体型组成顺序 RS6882076 和 RS4704727,单体型频率>5%

3 讨论

有关 TIM-1 和 TIM-3 基因多态性的研究在国内外相对较多,但由于 TIM-4 基因最近才被发现,故关于 TIM-4 基因多态性与哮喘的研究国内外均相对较少。夏义平等^[13]对湖北地区 145 例成年哮喘患者和 130 例健康人群的 TIM-4 基因的 3 个基因位点 PCR-RFLP 病例对照研究发现,中国汉族人群 TIM-4 基因 8570G>A 基因多态性与哮喘有关,未检测到 Thr179Ile(C>T)和 11515C>A 位点基因多态性,并且发现该位点的多态性不影响 IgE 水平。吴小慧等^[14]对湖北地区 185 名哮喘患者(年龄 3~69 岁)

和 162 名健康者的 TIM-4 基因 Lys65Lys(G/A)外显子 2 区、Val172Met(G/A)外显子 3 区、Val365Met(G/A)外显子 9 区 3 个位点的单核苷酸多态性进行了研究,发现外显子 2 区 Lys65Lys(G/A)存在基因多态性,但其位点的基因多态性与中国湖北地区汉族人群支气管哮喘无相关性,未发现 Val172Met(G/A)、Val365Met(G/A)2 个基因位点存在基因多态性。Nakajima 等^[10]报道在 32 名健康日本人、美国黑人中 Lys65Lys(G/A)位点的突变率分别为 3.1%和 1.6%,而吴小惠等^[14]在湖北地区健康人中检测到其突变率是 8%,在哮喘患者为 7%,与 Nakajima 等^[10]的研究存在较大差异,发生这种现象可能是由于遗传上的差异导致不同地域、种族人群相差较大,也与 Nakajima 等研究的样本例数较少有关。

蔡鹏程等^[15]对湖北地区 5~17 岁哮喘儿童采用错配引物 PCR-RFLP 病例对照研究,研究了 TIM-4 基因的启动子区 RS6874202 和 RS6882076 两个位点,发现 TIM-4 基因的 RS6874202 位点等位基因及基因型的频率在哮喘组和健康对照组之间的差异有统计学意义,而 TIM-4 基因的 RS6882076 位点等位基因及基因型的频率在哮喘组和健康对照组之间的差异无统计学意义,随后排除了年龄、性别、和被动吸烟这 3 种因素而进行的 logistic 回归分析也得出了相同的结论。RS6882076 位点位于 TIM-4 基因翻译起始 ATG 上游的-88 位点。本研究也发现 RS6882076 位点与儿童哮喘无相关性,与蔡鹏程等^[15]的研究一致。但 Ghecham^[12]在山东地区的人群研究却证实 RS6882076 位点基因型及等位基因频率在哮喘组和健康对照组之间差异存在统计学意义;同时也证实了内含子 2 区 RS4704727 与哮喘有关;他的研究结果还显示 RS6882076 位点和

RS4704727 位点之间存在较弱的连锁不平衡($r^2 = 0.122$),本研究也得出相似结果。这些基于不同地区、不同人群的多样性研究为哮喘易感基因的遗传学研究提供了重要的信息。

综上所述,本研究虽然是大样本的病例对照研究,但缺乏更为可靠的大样本且基于家系的病例对照研究结果支持。目前对 TIM-4 基因的研究尚处于起步阶段, TIM-4 基因 RS4704727 位点 G 突变为 T 是否影响 TIM-4 基因的转录效率而影响其生物学功能仍需进一步研究,从而明确它与人类气道高反应性及哮喘的关系。TIM-4 基因的研究仍需继续大样本多中心的合作研究,对 TIM-4 基因多态性与疾病的相关性研究,必将加深人们对自身免疫性疾病和变应性疾病发病机制的理解,为疾病的预防、诊断和治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] 黄东明,肖晓雄,何晓玲,崔碧云,汪叶红,李小琳,等. 学龄儿童支气管哮喘危险因素的调查[J]. 中国当代儿科杂志, 2011,13(5):370-372.

[2] Umetsu DT. Hygiene revisited: Microbes, apoptosis and TIM-1 in the development of asthma[J]. Paediatr Res Rev, 2010, 11(Suppl 1): S3.

[3] 全国儿童哮喘防治协作组. 中国城区儿童哮喘患病率调查[J]. 中华儿科杂志,2003,41(2):123-127.

[4] Cookson W. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases [J]. Immunol Rev, 2002, 190: 195-206.

[5] McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regula-

tory locus) and the linked Tim gene family[J]. Nat Immunol, 2001, 2(12): 1109-1116.

[6] Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity[J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 172-189.

[7] Rodriguez-Manzanet R, Meyers JH, Balasubramanian S, Slavik J, Kassam N, Dardalhon V, et al. TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival[J]. J Immunol, 2008, 180(7): 4706-4713.

[8] Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance[J]. Nature Immunol, 2005, 6(5): 447-454.

[9] Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation[J]. Nature Immunol, 2005, 6(5): 455-464.

[10] Nakajima T, Wooding S, Satta Y, Jinnai N, Goto S, Hayasaka I, et al. Evidence for natural selection in the HAVCR1 gene: high degree of amino-acid variability in the mucin domain of human HAVCR1 protein[J]. Genes Immun, 2005, 6(5): 398-406.

[11] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘防治常规(试行)[J]. 中华儿科杂志,2004,42(2):100-106.

[12] Ghecham A. TIM-4 基因多态性与中国汉族人群哮喘的相关性研究[D]. 山东大学,2009.

[13] 夏义平. TIM-4 基因多态性与变应性哮喘的相关性研究[D]. 华中科技大学,2007.

[14] 吴小慧,李一荣,陈请国,陈凤花,胡丽华. TIM-4 基因多态性与湖北地区汉族人群支气管哮喘易感性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2008,29(9):833-837.

[15] 蔡鹏程. TIM-4 基因多态性与变应性哮喘关系的病例对照及家系研究[D]. 华中科技大学,2009.

(本文编辑:邓芳明)