

论著·临床研究

儿童非特异性慢性咳嗽病因及与 *TRPV1* 基因多态性的关系

张小宁^{1,2} 杨娟³ 罗征秀² 罗健² 任洛¹ 李博¹ 陈坤华² 符州² 陆权⁴ 刘恩梅²

(1. 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014; 3. 河北省儿童医院重症监护病房, 河北 石家庄 050000; 4. 上海交通大学附属儿童医院呼吸科, 上海 200040)

[摘要] **目的** 研究儿童非特异性慢性咳嗽病因及与瞬时感受器离子通道受体1 (*TRPV1*) 基因多态性的关系。**方法** 对195例非特异性慢性咳嗽患儿首次就诊后半个月、1个月、3个月进行随访, 以明确病因。采用聚合酶链反应限制性酶切片段多态性 (PCR-RFLP) 方法对其进行 *TRPV1* 基因 rs222747、rs222748、rs8065080 位点的基因型和等位基因分析。205例健康或无慢性咳嗽的外科患儿作为对照。**结果** 195例非特异性慢性咳嗽患儿病因分布如下: 咳嗽变异性哮喘 (CVA) 96例 (49.2%)、CAV合并上气道咳嗽综合征 (CVA + UACS) 48例 (24.6%)、感染后咳嗽 34例 (17.4%)、上气道咳嗽综合征 (UACS) 17例 (8.7%)。*TRPV1* 基因 rs222747、rs222748、rs8065080 位点均可检出3种基因型: rs222747 (CC、GC、GG); rs222748 (CC、TC、TT); rs8065080 (CC、TC、TT)。rs222747 位点基因多态性分布不符合 Hardy-Weinberg 定律, 故未进行下一步分析。慢性咳嗽组和对照组比较 rs222748 位点、rs8065080 位点基因型和等位基因频率经 Bonferroni 多重检验校正差异均无统计学意义。**结论** 非特异性慢性咳嗽患儿中 CVA、UACS、感染后咳嗽是引起儿童慢性咳嗽的主要病因。*TRPV1* 基因 rs222748 和 rs8065080 位点基因多态性可能与非特异性慢性咳嗽的发生无关。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(7): 524-528]

[关键词] 慢性咳嗽; 瞬时感受器离子通道受体1; 基因多态性; 儿童

[中图分类号] R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)07-0524-05

Etiology of nonspecific chronic cough in children and relationship between *TRPV1* gene polymorphisms and nonspecific chronic cough

ZHANG Xiao-Ning, YANG Juan, LUO Zheng-Xiu, LUO Jian, REN Luo, LI Bo, CHEN Kun-Hua, FU Zhou, LU Quan, LIU En-Mei. Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing 400014, China (Liu E-M, Email: emliu186@hotmail.com)

Abstract: Objective To explore the causes of nonspecific chronic cough in children and relationship between transient receptor potential vanilloid 1 (*TRPV1*) gene polymorphisms and nonspecific chronic cough. **Methods** A total of 195 children with chronic cough were followed up half a month, one month and three months after their first visit to hospital. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to examine polymorphisms of the *TRPV1* gene in the children. A total of 205 healthy or surgical children without chronic cough served as the control group. **Results** The etiologic distribution of the 195 children with chronic cough was as follows: 96 (49.2%) cases of cough variant asthma (CVA), 48 (24.6%) cases of CVA complicated by upper airway cough syndrome (UACS), 34 (17.4%) cases of post-infectious cough, and 17 (8.7%) cases of UACS. Three genotypes were identified in both groups at positions rs222747 (CC, GC and GG), rs222748 (CC, TC and TT) and rs8065080 (CC, TC and TT). The frequencies of genotype and allele at position rs222747 did not accord with the law of Hardy-Weinberg. There was no significant difference in frequencies of genotype and allele at positions rs222748 and rs8065080 between the two groups. **Conclusions** CVA, UACS and post-infectious cough are common causes of nonspecific chronic cough in children. *TRPV1* gene polymorphisms at positions rs222748 and rs8065080 may be unrelated to nonspecific chronic cough in children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(7): 524-528]

Key words: Chronic cough; Transient receptor potential vanilloid 1; Gene polymorphism; Child

[收稿日期] 2012-02-02; [修回日期] 2012-04-03

[基金项目] 中华医学会临床医学慢性呼吸道疾病科研专项资金项目 (No. 08020760154)。

[作者简介] 张小宁, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 刘恩梅, 教授。

咳嗽是儿童呼吸系统疾病最常见的症状之一^[1],7~11岁的儿童中约9%曾患有慢性咳嗽^[2]。咳嗽也是一种重要的呼吸防御反射,气道的咳嗽感受器受到刺激后被激活,经咳嗽传入神经将冲动传入脑干咳嗽中枢,再经传出神经活化相应的肌群产生咳嗽。有研究显示位于咳嗽传入神经C纤维神经末梢的瞬时感受器离子通道受体1(transient receptor potential vanilloid-1, *TRPV1*)在咳嗽机制中发挥重要作用^[3]。*TRPV1*基因位于人类17p13染色体,有研究显示*TRPV1*基因UTR-3多态性与中国北京汉族儿童哮喘易感性相关^[4]。*TRPV1*基因多态性是否与儿童非特异性慢性咳嗽的发生相关,目前还未见相关报道。本研究通过分析非特异性慢性咳嗽患儿和对照儿童*TRPV1*基因rs222747、rs222748、rs8065080位点的多态性,探索*TRPV1*基因与儿童非特异性慢性咳嗽的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2008年6月至2010年10月在重庆医科大学附属儿童医院哮喘中心门诊就诊的非特异性慢性咳嗽(咳嗽>4周)患儿195例,其中男115例,女80例,年龄4个月至14岁,平均年龄 63 ± 34 个月。全部病例诊断按照中华医学会儿科学分会呼吸学组与《中华儿科杂志》编辑委员会2008年制定的《儿童慢性咳嗽诊断与治疗指南》的标准^[5]。详细询问病史(包括咳嗽病程,咳嗽性质,有无呼吸困难及喘息病史,有无鼻炎、鼻窦炎,有无哮喘及过敏性鼻炎家族史),全面体格检查及辅助检查。初诊后针对病因进行特异性治疗。首次就诊后半个月、1个月、3个月随访患儿情况,以明确病因,并及时修正诊断并制定下一步治疗方案。以2009年5月至2011年5月体检正常儿童和重庆医科大学附属儿童医院骨科病房住院的外伤患儿共205例为对照组,均无慢性咳嗽及喘息病史,其中男127例,女78例,年龄1~14岁,平均年龄 66 ± 31 个月。

1.2 方法

采用聚合酶链反应限制性酶切片段多态性(PCR-RFLP)方法对195例慢性咳嗽患儿及205例对照儿童进行*TRPV1*基因rs222747、rs222748、rs8065080位点的基因型和等位基因分析。

1.2.1 *TRPV1*基因多态性位点选择 采用Haploview(4.2)软件选择*TRPV1*基因的标签单核苷酸多态性(SNP),从中选择位于外显子区域的

rs222747、rs222748、rs222749位点,因rs222749位点未找到合适的酶切位点,故未纳入本研究。Cantero-Recasens等^[6]研究发现在哮喘患儿中rs8065080位点基因多态性与喘息和咳嗽的发作有关,故将rs8065080位点纳入本研究。rs222747位于*TRPV1*基因第9个外显子(参考序列NG-029716.1),rs222747位点的C/G突变在蛋白水平表现为TRPV1-315位点异亮氨酸变为蛋氨酸;rs222748位于*TRPV1*基因第7个外显子(参考序列NG-029716.1),rs222748位点的C/T突变在蛋白水平表现为TRPV1-167位点组氨酸的同义突变;rs8065080位于*TRPV1*基因第15个外显子(参考序列NG-029716.1),rs8065080位点的C/T突变在蛋白水平表现为TRPV1-585位点缬氨酸变为异亮氨酸。

1.2.2 标本采集及血液基因组DNA的提取 慢性咳嗽组及对照组均采集经肝素钠抗凝的静脉血,用TIANamp DNA提取试剂盒法提取血液基因组DNA(TIANamp 天根生化科技有限公司)。

1.2.3 引物设计 PCR引物采用在线引物设计(<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>),检测rs222747位点等位基因引物序列:上游引物5'-CAGAGACAGAGGGAGTTTGA-3',下游引物5'-ACACACAGATAGCGACGCCA-3';rs222748位点上游引物:5'-TGCTGTCCCAGGACTCTGT-3',下游引物5'-AGGATCCCAGAGAAGCAAGGA-3';rs8065080位点上游引物5'-CAAGTCCTGGAGCTCATTTC-3',下游引物5'-GCCCTGACCCAGGTATGTGTA-3'。由上海Invitrogen公司合成,缓冲液配成100 μmol/L, -20℃保存,使用前稀释成10 μmol/L。

1.2.4 PCR扩增目的基因 PCR扩增用PCR(Taq)扩增试剂盒(KT201),PCR反应体系均为25 μL,浓度为10 μmol/L的上下游引物各1 μL,2×PCR mix(包含Taq DNA聚合酶、dNTPs、MgCl₂、PCR反应的增强剂和优化剂以及稳定剂)12.5 μL, ddH₂O 8.5 μL。按下列程序进行PCR扩增:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,62℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃再延伸5 min。rs222747、rs222748、rs8065080位点PCR产物长度分别为487 bp、486 bp、486 bp。

1.2.5 限制性片段长度多态性分析 rs222747位点PCR产物酶切反应体系为20 μL,10×NEB缓冲液2 μL,PCR产物10 μL,限制性内切酶BsaBI(纽英伦生物技术有限公司)0.5 μL,灭菌双蒸水7.5 μL,65℃水浴3 h,2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下观察,判断基因型。rs222748位点、

rs8065080 位点 PCR 产物酶切反应体系为 20 μ L, 10 \times NEB 缓冲液 2 μ L, PCR 产物 10 μ L, 100 \times BSA 0.2 μ L, 限制性内切酶 Hpy99I(纽英伦生物技术有限公司) 0.5 μ L, 灭菌双蒸水 7.3 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下观察, 判断基因型。

1.2.6 PCR-RFLP 的方法学验证 随机抽取部分用 PCR-RFLP 方法鉴定的 rs222747、rs222748、rs8065080 位点野生纯合子、突变杂合子、突变纯合子 PCR 产物送公司(北京华大基因科技有限公司)测序验证。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析。基因型及等位基因用频数及百分率(%)表示, 组间等位基因和基因型显著性比较用 χ^2 检验, 采用 Bonferroni 检验进行多重检验校正, 校正因子为 $n(m-1)$ (n : SNPs 位点的个数, m : 等位基因型的个数), $P \leq 0.05/[n(m-1)]$ (即 $P \leq 0.0167$) 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 儿童非特异性慢性咳嗽病因随访

195 例非特异性慢性咳嗽患儿经过 3 个月随访后明确病因如下: 咳嗽变异性哮喘(CVA)患儿 96 例(49.2%), CAV 合并上气道咳嗽综合征(CVA + UACS)患儿 48 例(24.6%), 感染后咳嗽患儿 34 例(17.4%), 上气道咳嗽综合征(UACS)患儿 17 例

(8.7%)。不同年龄组非特异性慢性咳嗽病因分布不同($\chi^2 = 18.479, P = 0.005$)。见表 1。

表 1 不同年龄组非特异性慢性咳嗽患儿病因分布 [例(%)]

年龄	例数	CVA	CVA + UACS	感染后咳嗽	UACS
<3 岁	35	16(46)	7(20)	11(31)	1(3)
3 岁~	93	57(61)	19(20)	9(10)	8(9)
6~14 岁	67	23(34)	22(33)	14(21)	8(12)

注: CVA 指咳嗽变异性哮喘, UACS 指上气道咳嗽综合征

2.2 TRPV1 基因 rs222747、rs222748 及 rs8065080 位点基因型

在慢性咳嗽患儿和对照儿童中, rs222747、rs222748、rs8065080 位点均可检出 3 种基因型: rs222747 (CC、GC、GG); rs222748 (CC、TC、TT); rs8065080 (CC、TC、TT) (图 1)。3 种基因型的扩增产物进行测序分别测出野生型、突变型纯合子和杂合子, 与 PCR-RFLP 方法结果一致(图 2)。经吻合度检验, rs222747 位点基因多态性分布(表 2)不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P < 0.05$), 故未进行下一步分析。rs222748、rs8065080 位点基因多态性分布在各组均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P > 0.05$)。

2.3 TRPV1 基因 rs222748 和 rs8065080 位点在两组儿童中基因型分布及等位基因频率

慢性咳嗽组及对照组儿童 rs222748、rs8065080 位点基因型分布及等位基因频率经 Bonferroni 检验校正差异无统计学意义, 见表 3~4。

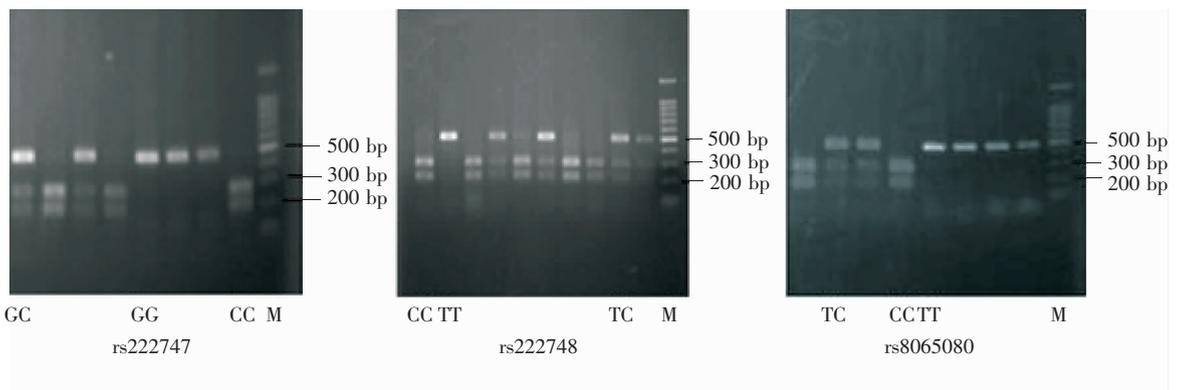


图 1 rs222747、rs222748、rs8065080 位点酶切电泳图 rs222747 位点 3 种基因型: GC、GG、CC; rs222748

3 种基因型: CC、TT、TC; rs8065080 位点 3 种基因型: TC、CC、TT; M 为 Marker。

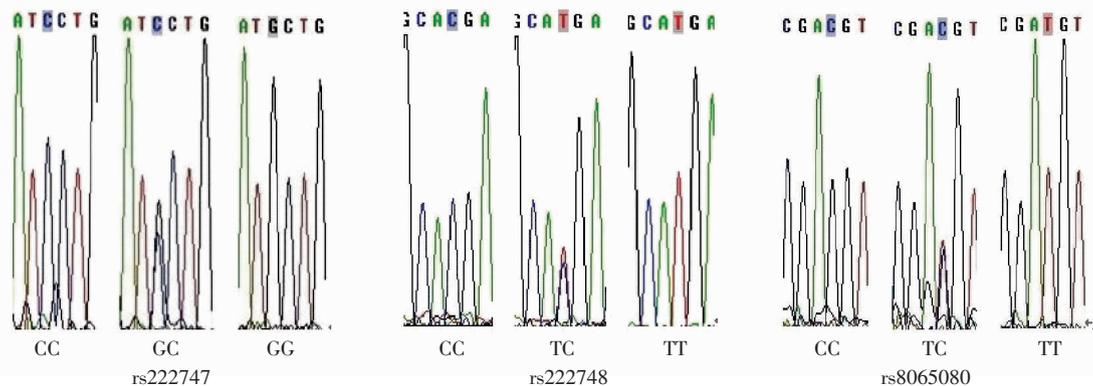


图2 rs222747、rs222748及rs8065080位点测序图(阴影处为目标位点) rs222747位点3种基因型:CC、GC、GG; rs222748位点3种基因型:CC、TC、TT;rs8065080位点3种基因型:CC、TC、TT。

表2 两组rs222747位点基因型及等位基因分布 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	GC	GG	C	G
对照组	205	32(15.6)	106(51.7)	67(32.7)	170(41.5)	240(58.5)
慢性咳嗽组	195	22(11.3)	108(55.4)	65(33.3)	152(39.0)	238(61.0)

表3 两组rs222748位点基因型及等位基因分布 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	TC	TT	C	T
对照组	205	117(57.1)	75(36.6)	13(6.3)	309(75.4)	101(24.6)
慢性咳嗽组	195	93(47.7)	91(46.7)	11(5.6)	277(71.0)	113(29.0)
χ^2 值		4.204			1.922	
P值		0.124			0.175	

表4 两组rs8065080位点基因型及等位基因分布 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	TC	TT	C	T
对照组	205	69(33.7)	103(50.2)	33(16.1)	241(58.8)	169(41.2)
慢性咳嗽组	195	55(28.2)	91(46.7)	49(25.1)	201(51.5)	189(48.5)
χ^2 值		5.198			4.240	
P值		0.075			0.046	

3 讨论

本研究195例非特异性慢性咳嗽患儿中,CVA、UACS、感染后咳嗽是引起儿童慢性咳嗽的主要病因,与张晓波等^[7]报道相似。CVA合并UACS患儿48例,提示在儿童非特异性慢性咳嗽的诊断中应注意两种病因合并存在的情况。

TRPV1是瞬时感受器离子通道蛋白(TRP)家族的一个亚群,广泛分布于哺乳动物的呼吸系统感觉神经,尤其是无髓鞘的C纤维神经末梢^[8]。TRPV1可被辣椒素和多种炎性物质(如三磷酸腺苷、

缓激肽、前列腺素E2等)激活。有研究显示在慢性咳嗽病人TRPV1表达升高^[9],并发现慢性咳嗽病人气道黏膜TRPV1表达神经密度与辣椒素激发试验检测的咳嗽敏感性显著相关^[10]。Veronesi等^[11]研究表明,辣椒素颗粒性吸入物及多种内源性炎性物质可协同作用于呼吸道上皮细胞上TRPV1通道,从而促进炎性介质(IL-6、IL-8、TNF等)释放,后者进一步激活或敏化分布于呼吸道黏膜的感觉神经TRPV1通道,最后以P物质释放的形式通过神经传导介导了咳嗽病理的发生。

TRPV1基因位于人类17p13染色体,rs222748位于TRPV1基因第7个外显子(参考序列NG-

029716.1), rs222748 位点的 C/T 突变在蛋白水平表现为 TRPV1-167 位点组氨酸的同义突变; rs8065080 位于 *TRPV1* 基因第 15 个外显子(参考序列 NG-029716.1), rs8065080 位点的 C/T 突变在蛋白水平表现为 TRPV1-585 位点缬氨酸变为异亮氨酸。本研究中非特异性慢性咳嗽组和对照组比较, rs222748 和 rs8065080 位点基因型经多重检验校正差异均无统计学意义。Cantero-Recasens 等^[6] 研究发现 rs8065080 位点基因多态性与哮喘的发生无关, 但在哮喘患儿中既往 1 年有喘息和咳嗽发作的患儿 T 等位基因明显增多; 受到热或辣椒素刺激时转染 *TRPV1*-Ile-585 的希拉细胞(HeLa cells)内 Ca^{2+} 明显高于转染 *TRPV1*-Val-585 的希拉细胞。本研究结果发现非特异性慢性咳嗽组和对照组 rs8065080 位点基因型和等位基因比较差异虽无统计学意义, 但表现出与儿童非特异性慢性咳嗽相关的趋势(基因型 $P=0.075$, 等位基因 $P=0.046$), 可能与本研究中样本量较少有关。rs222748 位点与慢性咳嗽的关系目前还未见相关报道。rs222748 位点、rs8065080 位点基因多态性与儿童非特异性慢性咳嗽的关系还需要经多中心大样本基因多态性分析进一步研究。

综上所述, 非特异性慢性咳嗽患儿中 CVA、UACS 和感染后咳嗽是引起儿童慢性咳嗽的主要病因。*TRPV1* 基因 rs222748 位点、rs8065080 位点基因多态性可能与非特异性慢性咳嗽无关。由于本实验研究的样本量不够大, *TRPV1* 基因多态性与儿童非特异性慢性咳嗽的关系还需要经多中心大样本基因多态性分析进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(11): 738-744.
- [2] Leonardi GS, Houthuijs D, Nikiforov B, Volf J, Rudnai P, Zejda J, et al. Respiratory symptoms, bronchitis and asthma in children of Central and Eastern Europe[J]. Eur Respir J, 2002, 20(4): 890-898.
- [3] Lee LY, Ni D, Hayes D Jr, Lin RL. *TRPV1* as a cough sensor and its temperature-sensitive properties [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24(3): 280-285.
- [4] 王强, 白雪涛, 徐东刚, 徐东群, 李红, 方建龙, 等. *TRPV1* UTR-3 基因多态性与北京汉族儿童哮喘的易感性研究[J]. 卫生研究, 2009, 38(5): 516-521.
- [5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童慢性咳嗽诊断与治疗指南(试行)[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(2): 104-107.
- [6] Cantero-Recasens G, Gonzalez JR, Fandos C, Duran-Tauleria E, Smit LA, Kauffmann F, et al. Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (*TRPV1*) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma[J]. J Biol Chem, 2010, 285(36): 27532-27535.
- [7] 张晓波, 农光民. 儿童慢性咳嗽 111 例病因分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(2): 131-134.
- [8] Lee LY, Pisani T. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers[J]. Respir Physiol, 2001, 125(1-2): 47-65.
- [9] Mitchell JE, Campbell AP, New NE, Sadofsky LR, Kastelik JA, Mulrennan SA, et al. Expression and characterisation of the intracellular vanilloid receptor (*TRPV1*) in bronchi from patients with chronic cough[J]. Exp Lung Res, 2005, 31(3): 295-306.
- [10] Groneberg DA, Niimi A, Dinh QT, Cosio B, Hew M, Fischer A, et al. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(12): 1276-1280.
- [11] Veronesi B, Oortgiesen M. The *TRPV1* receptor: target of toxicants and therapeutics[J]. Toxicol Sci, 2006, 89(1): 1-3.

(本文编辑: 邓芳明)