

198 例哮喘儿童遗传易感性研究

郑伯强¹ 王桂兰¹ 杨赛¹ 鲁衍强² 刘睿俊² 李璘²

(1. 中山市博爱医院儿科, 广东 中山 528403; 2. 上海靶向分子医学研究所, 上海 200433)

[摘要] 目的 分析4种哮喘相关基因位点在198例哮喘患儿中的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分布特点,并探讨其与儿童哮喘遗传易感性及某些哮喘临床表型的关系。方法 采用聚合酶链反应产物电泳鉴定法及实时荧光定量核酸扩增技术检测4种哮喘相关基因位点SNP在198名哮喘患儿和110名健康对照者中的分布,并测定哮喘患儿的血清总IgE(TIgE)水平及嗜酸性粒细胞比例(%EOS),同时对4种哮喘相关基因位点不同基因型间的TIgE及%EOS分别进行比较分析。结果 血管紧张素转换酶(ACE)基因位点纯合子基因型(DD)频率在哮喘组明显高于健康对照组($\chi^2 = 30.667, P < 0.01$),且D型等位基因频率在哮喘组亦明显高于健康对照组($\chi^2 = 7.151, P < 0.01$);各基因位点多态性分布与血清TIgE水平及%EOS均无相关性(均 $P > 0.05$)。结论 ACE基因DD基因型与儿童哮喘的遗传易感性有关,可能是儿童哮喘的危险因素。

[中国当代儿科杂志,2012,14(11):811-814]

[关键词] 哮喘;单核苷酸多态性;遗传易感性;儿童

[中图分类号] R562.2⁺5 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)11-0811-04

Study of genetic susceptibility in 198 children with asthma

ZHENG Bo-Qiang, WANG Gui-Lan, YANG Sai, LU Yan-Qiang, LIU Rui-Jun, LI Ying. Department of Pediatrics, Bo'ai Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528403, China (Wang G-L, Email:13924973891@139.com)

Abstract: Objective To analyze the frequency distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of four asthma-related gene loci (ACE I/D; ADRB2 Arg16Gly; TNF- α G-308A; MS4A2 Glu237Gly) in 198 asthmatic children, and to investigate its association with genetic susceptibility to childhood asthma and some clinical phenotypes of asthma. **Methods** Polymerase chain reaction product electrophoresis identification and real-time quantitative PCR detecting system were used to determine the frequency distributions of the SNPs of the four asthma-related gene loci in 198 asthmatic children and 110 healthy controls. The serum total IgE (TIgE) levels and blood eosinophil proportion (%EOS) of the asthmatic children were measured. Different genotypes at the four asthma-related gene loci were compared in terms of TIgE and %EOS. **Results** The genotype DD of angiotensin-converting enzyme (ACE) had a significantly higher frequency in the asthmatic children than in the healthy controls ($\chi^2 = 30.667, P < 0.01$), and the frequency of D allele was also significantly higher in the asthmatic children than in the healthy controls ($\chi^2 = 7.151, P < 0.01$). No correlation was found between the polymorphism of each gene locus and serum TIgE level and %EOS ($P > 0.05$). **Conclusions** Genotype DD of ACE is related to genetic susceptibility to childhood asthma and may be the risk factor for childhood asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(11):811-814]

Key words: Asthma; Single nucleotide polymorphism; Genetic susceptibility; Child

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病,临床表现具有高度异质性,其表型主要包括气道高反应性、血清总IgE(TIgE)升高、嗜酸性粒细胞比例(%EOS)增高等,为遗传和环境共同作用的多基因遗传性疾病,遗传度约为36%~79%^[1-2],严重威胁到世界范围内约3亿人的生命健康^[3]。2009年全球哮喘防治倡议(GINA)指出,近20年来各年龄段哮喘发病率明显升高,尤其是儿童。影响儿童哮喘的主要因素有遗传、呼吸道感染、特应性体质、父母吸烟史等,但由于生活环境因素的不同,各地儿童哮喘的发病率及高危因素亦有不同。我国儿童哮喘防治协作组2000年的统计资料显示,中国儿童哮喘发病率平均约1.97%,且南方儿童患病率高于北方^[4]。为此,本课题组前期对中山市儿童哮喘进行了流行病学调查,发现中山市儿童哮喘发病率为1.71%,并已获全国

[收稿日期]2012-06-06;[修回日期]2012-07-13
[作者简介]郑伯强,男,大学,副主任医师。
[通信作者]王桂兰,主任医师。

儿童哮喘防治协作组最后确认。由于哮喘易感基因具有地域差异,这使得在某一人群中发现的与哮喘相关的基因在其他人群中可能并不与哮喘相关,且目前尚未有机构对广东地区儿童哮喘基因多态性进行研究。因此,本课题选择了 4 种目前在国内外已有较为肯定研究成果的哮喘相关基因进行研究,旨在从基因层面上对儿童哮喘进行风险预测和防治。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 7 月 1 日至 2011 年 12 月 30 日在我院小儿呼吸专科诊断为儿童支气管哮喘的 0~14 岁患儿 198 例为哮喘组,其中男 104 例,女 94 例,平均年龄 3.5 岁;另选择与病例组基本资料相近且无身心相关疾病的健康儿童 110 例为对照组,其中男 60 例,女 50 例,平均年龄 3.8 岁。所有支气管哮喘患儿的诊断标准均符合中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的标准^[5]。两组儿童在年龄、性别方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 SNP 检测方法 采集两组儿童的口腔黏膜上皮细胞,由上海靶向分子医学研究所进行 DNA 提取并对血管紧张素转换酶(ACE)基因 I/D、 $\beta 2$ 肾上腺素能受体(ADRB2)基因 Arg16Gly、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因 G-308A 及 IgE 高亲和力受体 β 链(MS4A2)基因 Glu237Gly 4 种哮喘相关基因位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)进行检测。采用 PCR-RFLP 法检测 ACE 基因 I/D SNP:引物由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列为:上游 5'-CTGGAGACCACTC-CCATCCTTTCT-3';下游 5'-GATGTGGCCATCACAT-TCGTCAGAT-3'。采用 ABI 7900HT 型荧光定量 PCR 仪进行基因扩增,反应体系共 10 μ L,其中包含 Taq Mix 5 μ L,上下游引物各 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L,去离子水(ddH₂O)2 μ L;反应条件为:95℃ 预变性 15 min;95℃ 变性 45 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,循环 35 个周期,最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。反应完毕后取 1 μ L 溴酚蓝与 4 μ L 扩增产物混合,点样于 2% 琼脂糖凝胶(内含溴乙锭)孔中,以 120 V 进行电泳 30 min,完成后将凝胶转移入凝胶成像系统中,通过电脑屏幕进行图象分析并观察结果。

采用实时荧光定量核酸扩增法(QPCR)检测 ADRB2 基因 Arg16Gly、TNF- α 基因 G-308A、MS4A2 基因 Glu237Gly SNP;同样采用 ABI 7900HT 型荧光定量 PCR 仪进行基因扩增,反应体系 10 μ L,其中包含 Taqman Universal MasterMix 5 μ L, DNA 模板 1 μ L, Taqman-MGB 探针 0.5 μ L, ddH₂O 3.5 μ L;反应条件为 95℃ 预变性 10 min;92℃ 15 s,60℃ 1 min,循环 20 个周期;89℃ 15 s,60℃ 90 s,循环 30 个周期。反应结束后于 ABI 7900HT 型荧光定量 PCR 仪上读取样品孔中的终点荧光,利用分析软件确定各个样本的基因分型结果。

1.2.2 血 TIgE 水平及 %EOS 检测方法 采集两组儿童静脉血 2 mL,采用 UniCAP100 全自动过敏原体外检测仪(瑞典法玛西亚公司)对血 TIgE 水平进行免疫荧光分析;%EOS 由全自动六分类血细胞分析仪测定。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料采用频数表示。基因型采用直接计数法,等位基因数=该基因纯合子数 $\times 2$ +该基因杂合子数,且等位基因确认符合 Hardy-Weinberg 平衡;哮喘组 and 对照组间基因频率的比较采用 χ^2 检验;血 TIgE 水平及 %EOS 各基因型组离散程度相差悬殊,不服从正态分布,故组间比较采用秩和检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种哮喘相关基因位点基因多态性与哮喘的关系

4 种哮喘相关基因位点(ACE 基因 I/D;ADRB2 基因 Arg16Gly;TNF- α 基因 G-308A;MS4A2 基因 Glu237Gly)中仅 ACE 基因 DD 基因型及 D 型等位基因在哮喘组及对照组中差异有统计学意义(均 $P<0.01$),见表 1。

2.2 4 种哮喘相关基因位点 SNP 分布与 TIgE 及 %EOS 的关系

TIgE、%EOS 在 4 种哮喘相关基因位点各基因型之间的差异均无统计学意义,即各基因位点多态性分布与血清 TIgE 水平及 %EOS 均无相关性。见表 2。

表 1 4 种哮喘相关基因位点多态性在两组中的比较 (例)

组别	例数	ACE I/D		ADRB2 Arg16Gly		TNF-α G-308A		MS4A2 Glu237Gly	
		I/D	II/ID/DD	A/G	AA/AG/GG	A/G	AA/AG/GG	A/G	AA/AG/GG
对照组	110	139/ 81	44/51/15	117/103	31/55/24	17/203	0/17/93	181/39	76/29/5
哮喘组	198	206/190	83/40/75	241/155	71/99/28	35/361	5/25/168	313/83	126/61/11
χ ² 值		7.151	30.667	3.424	3.217	0.226	3.193	0.930	0.938
P 值		0.007	<0.001	0.064	0.200	0.635	0.203	0.335	0.626

表 2 4 种哮喘相关基因位点各 3 种基因型之间血 TIgE 和 %EOS 的比较

基因位点	基因型	例数	TIgE	χ ² 值	P 值	% EOS	χ ² 值	P 值
ACE I/D	DD	75	30.53	0.042	0.979	77.08	2.916	0.233
	ID	40	30.08			61.22		
	II	83	29.43			69.66		
ADRB2 Arg16Gly	AA	71	24.31	1.183	0.554	75.83	0.358	0.836
	AG	99	29.96			69.80		
	GG	28	31.94			69.59		
TNF-α G-308A	AA	5	31.67	1.236	0.539	54.50	0.744	0.689
	AG	25	25.08			73.91		
	GG	168	31.23			70.55		
MS4A2 Glu237Gly	AA	126	25.50	2.088	0.352	83.05	5.080	0.079
	AG	61	29.87			73.42		
	GG	11	33.43			63.73		

注:TIgE 和 % EOS 不服从正态分布,用秩次表示,采用秩和检验。

3 讨论

哮喘作为一种多基因复杂性疾病,其发病与许多基因和环境因素有关。近年来随着复杂性疾病遗传研究手段的提高和分析方法的进步,哮喘遗传学的研究进展很快。用候选基因法及全基因组关联研究发现 200 多个与哮喘相关的基因,43 个已在多个人群中成功得到独立重复实验验证^[6]。而 ACE 基因 I/D、ADRB2 基因 Arg16Gly、TNF-α 基因 G-308A 和 MS4A2 基因 Glu237Gly 是其中 4 种目前国内外研究较为肯定的哮喘相关基因位点。

ACE 是血管紧张素系统的关键酶,广泛存在于肺、心、肾等组织的血管内皮和上皮细胞膜,肺部具有高表达,是激肽、缓激肽、P 物质等炎性介质在肺内的主要调控酶^[7]。ACE 基因插入缺失 (I/D) SNP 与血清和细胞内 ACE 活性水平密切相关,ACE 基因共有 DD、DI、II 3 种基因型,人群中每个个体的 ACE 水平都非常稳定,但不同基因型个体间血清 ACE 水平却存在较大差异,DD 型表达者 ACE 活性最强,DI 型次之,II 型活性最低,DD 型约为 II 型的 2 倍^[8]。且多数研究表明,哮喘患者外周血白细胞 ACE 基因 I/D SNP 分布主要以 DD 型为主,因而认为 DD 型表达与哮喘发病的危险性有密切关系,血浆内

ACE 的高表达是哮喘的一个重要指标^[9-10]。此外,Vercelli^[11]研究发现 ADRB2 和 TNF-α 基因是与肺功能、气道重塑和疾病严重性相关的基因。高光凯等^[12]发现我国北方汉族人群 ADRB2 基因 Arg16Gly SNP 与支气管哮喘相关联。Ober 等^[13]总结出哮喘相关基因 TNF-α 已在超过 10 个独立样本人群研究中得以重复。另有研究证明 MS4A2 基因 Glu237Gly SNP 与儿童哮喘相关,并且已在澳大利亚和日本人群中得到证实^[14-15]。

本研究结果显示,哮喘组 ACE 基因 I/D 的 DD 基因型频率及 D 型等位基因频率均显著高于健康对照组,而其他 3 种基因位点多态性分布在两组间差异均无统计学意义,推测 ACE 基因 I/D 多态性中 DD 基因型表达者更具有发生哮喘的易感性,提示 ACE 基因 I/D 多态性可能与中山市儿童哮喘发生有关,且可能的作用机制为 DD 基因型导致 ACE 的高表达,ACE 则主要通过血管紧张素 II (angiotensin II, A II) 的表达起作用, A II 不但可引起强烈的气道平滑肌的收缩,导致哮喘发作,还可通过激活激肽、缓激肽、P 物质系统,参与哮喘的发生和发展。而其他 3 种哮喘相关基因未在本研究中得以重复的原因可能是本研究人群样本量小,缺乏足够的对照组人群,遗传异质性以及统计学分析的有限性等。还有理论认为复杂性疾病是由许多基因的微效作用

所引起,在发现的哮喘易感基因中,其中的单一基因对疾病表型的影响是很弱的。

外周血 TIgE 水平及% EOS 升高是哮喘的两种不同临床表型,研究表明血清 TIgE 水平有约50% ~ 80% 的遗传度^[16],% EOS 同样存在一个高家族聚集倾向。许多研究发现血清 TIgE 浓度及% EOS 水平与某些哮喘相关基因位点存在基因连锁^[17-20],即哮喘相关基因不直接参与这两种表型的调控,之所以与哮喘表型相关是两者之间存在连锁不平衡所致。而本研究中4种哮喘相关基因位点 SNP 与哮喘患儿外周血的 TIgE 及% EOS 均无相关性,与以往某些研究结果相似^[21-22]。因此可推测调控 TIgE 水平及% EOS 的重要调控基因与本研究的4种哮喘相关基因位点不存在连锁不平衡现象。同时也可能与研究人群样本量小有关。

总之,本研究发现 ACE 基因 I/D 多态性可能与中山市儿童哮喘发生有关,从而可以在基因层面对中山市儿童哮喘进行风险预测和防治。

[参 考 文 献]

[1] Beasley R. The burden of asthma with specific reference to the United States[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(5 Suppl): S482-S489.

[2] Zhang J, Paré PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics[J]. Respir Res, 2008, 9: 4.

[3] Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma; executive summary of the GINA Dissemination Committee report[J]. Allergy, 2004, 59(5): 469-478.

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

[5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 745-753.

[6] Weiss ST, Raby BA, Rogers A. Asthma genetics and genomics 2009[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(3): 279-282.

[7] LeeYC, Cheon KT, Lee HB, Kim W, Rhee YK, Kim DS. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with asthma[J]. Allergy, 2000, 55(10): 959-963.

[8] Tomita H, Sawto S, Matsuda R, Ogisu N, Mori T, Niimi T, et al. Genetic polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) in asthmatic patients[J]. Respir Med, 1998, 92(12): 1305-1310.

[9] Gao J, Lin Y, Xiao Y, Xu K, Xu W, Zhu Y, et al. Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene and genetic susceptibility to asthma with familial aggregation[J]. Chin Med Sci J, 2000, 15(1): 24-28.

[10] Urhan M, Degirmerci I, Harmanci E, Gunes HV, Metintas M, Basaran A. High frequency of DD polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in Turkish asthmatic patients[J]. Allergy Asthma Proc, 2004, 25(4): 243-247.

[11] Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(3): 169-182.

[12] 高光凯,王士雯,张进川. 中国北方汉族人群支气管哮喘患者β2肾上腺素能受体基因多态性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志. 2000, 23(2): 93-97.

[13] Ober C, Hoffjan S. Asthmagenetics 2006: the long and winding road to gene discovery[J]. Genes Immun, 2006, 7(2): 95-100.

[14] Hill MR, Cookson WO. A new variant of the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI beta E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyper-responsiveness[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(7): 959-962.

[15] Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, et al. Association between atopic asthma and a coding variant of Fc epsilon RI beta in a Japanese population[J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(8): 1129-1130.

[16] Raby BA, Soto-Quiros ME, Avila L, Lake SL, Murphy A, Liang C, et al. Sex-specific linkage to total serum immunoglobulin E in families of children with asthma in Costa Rica[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(3): 243-253.

[17] Deware JC, Wilkinson J, Wheatley A, Thomas NS, Doull I, Morton N, et al. The glutamine 27 β2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families[J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100(2): 261-265.

[18] Weidinger S, Gieger C, Rodriguez E, Baurecht H, Mempel M, Klopp N, et al. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus[J]. PLoS Genet, 2008, 4(8): e1000166.

[19] Nagarkatti R, B-Rao C, Vijayan V, Sharma SK, Ghosh B. Signal transducer and activator of transcription 6 haplotypes and asthma in the Indian population[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(3): 317-321.

[20] Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, Ponting CP, Broxholme J, Holt R, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influence immunoglobulin E levels and asthma[J]. Nat Genet, 2003, 34(2): 181-186.

[21] 张爱民,李海林,郝萍,陈燕华,李继梅,莫亚雄,等. 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[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 109-112.

[22] 张喜英,赵文利,桂芹,何念海. β2-肾上腺素能受体基因多态性与儿童哮喘的关系[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(5): 399-402, 408.

(本文编辑:万静)