

论著·临床研究

CHI3L1 基因单核苷酸多态性与儿童哮喘易感性的相关性研究

李基明¹ 张慧芬² 沈晓丽³ 谢辉² 吴星东² 沈彤² 王烨¹

(厦门市妇幼保健院 1. 检验科; 2. 儿内科, 福建 厦门 361003;
3. 福建省立医院中心实验室, 福建 福州 350001)

[摘要] **目的** 探讨 CHI3L1 基因单核苷酸多态性 (SNP) 与儿童哮喘易感性之间的相关性。**方法** 选取 2011 年 1 月至 2013 年 10 月确诊为哮喘的 316 例儿童为哮喘组, 同期选取 297 例健康儿童作为对照组。采集所有研究对象外周血, 应用化学发光法和流式细胞术分别检测两组总 IgE 水平和嗜酸性粒细胞比例, ELISA 法检测 YKL-40 水平; 提取外周血细胞基因组 DNA, 应用 Mass ARRAY-IPLEX 质谱阵列技术检测 CHI3L1 基因 rs4950928、rs10399805 和 rs883125 位点的单核苷酸多态性, 统计分析上述位点基因型及等位基因分布频率。

结果 哮喘组总 IgE 和 YKL-40 浓度均较对照组显著升高 (均 $P < 0.05$), 而嗜酸性粒细胞比例在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。哮喘组 rs883125 位点的 GG 基因型频率高于对照组 ($P < 0.05$)。rs4950928 位点 CC 基因型在哮喘组中的频率低于对照组, 而 CG 基因型频率则高于对照组 ($P < 0.05$); 该位点 GG 和 CG 基因型的哮喘组患儿总 IgE 和 YKL-40 水平相对 CC 基因型患儿明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** YKL-40 可作为初步诊断儿童哮喘的分子标记物; CHI3L1 基因的 rs4950928 和 rs883125 多态性可能为儿童哮喘的易感因子; rs4950928 位点 G 等位基因可能是提高哮喘风险的易感因子。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(2): 144-148]

[关键词] CHI3L1 基因; 单核苷酸多态性; 哮喘; 儿童

Association between CHI3L1 SNPs and susceptibility to childhood asthma

LI Ji-Ming, ZHANG Hui-Fen, SHEN Xiao-Li, XIE Hui, WU Xing-Dong, SHEN Tong, WANG Ye. Department of Clinical Laboratory, Xiamen Maternal and Children's Hospital, Xiamen, Fujian 361003, China (Email: lijm2030@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the association between CHI3L1 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the susceptibility to childhood asthma. **Methods** A total of 316 children diagnosed with asthma between January 2011 and October 2013 and 297 healthy children were selected as asthma group and control group respectively. Peripheral blood samples were collected from all subjects. Chemiluminescence and flow cytometry were applied to measure total IgE level and the percentage of eosinophils. ELISA was used to measure YKL-40 level. Genomic DNA was extracted from peripheral blood hemocytes, and the genotype and allele frequencies at CHI3L1 SNPs rs4950928, rs10399805, and rs883125 were determined by MALDI-TOP mass spectrometry. **Results** The total IgE and YKL-40 levels were significantly higher in the asthma group than in the control group ($P < 0.05$), while the percentage of eosinophils showed no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). The frequency of GG genotype at rs883125 in the asthma group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). For rs4950928, the asthma group had a significantly lower frequency of CC genotype ($P < 0.05$) but a significantly higher frequency of CG genotype ($P < 0.05$) compared with the control group. In the asthma group, the patients with GG and CG genotypes at rs4950928 had significantly increased total IgE and YKL-40 levels compared with those with CC genotype at this locus ($P < 0.05$). **Conclusions** YKL-40 is a potential molecular biomarker for the primary diagnosis of childhood asthma. CHI3L1 SNPs rs4950928 and rs883125 may be associated with childhood asthma. G allele at rs4950928 may increase the risk of childhood asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(2): 144-148]

Key words: CHI3L1; Single nucleotide polymorphism; Asthma; Child

[收稿日期] 2014-07-31; [接受日期] 2014-09-26

[基金项目] 福建省卫生厅青年课题 (2012-2-96)。

[作者简介] 李基明, 男, 硕士, 主管技师。

哮喘是一种严重影响儿童身心健康的常见慢性呼吸道疾病。据报道,我国主要城市城区儿童哮喘总患病率为3.02%^[1]。迄今为止,儿童哮喘虽然是可控制的,但受环境及认知等影响,其现患率仍不断上升^[2],因此,探讨哮喘的发病机制是防治哮喘发病的根本途径。

哮喘的发生涉及多个基因的紊乱^[3-4]。CHI3L1基因是一种新发现的哮喘相关基因,位于人类染色体1q31-q32的高度保守区,基因组DNA长约10.9 kb,基因组结构显示其由分布于8 kb区域上的10个外显子构成。CHI3L1基因在人体内广泛表达,其编码蛋白YKL-40是一种几丁质酶样蛋白,其主要功能是水解环境中多余的几丁质聚合物。几丁质酶在免疫反应中起着非常重要的作用。例如,Hong等^[5]发现几丁质酶能够激活呼吸道上皮细胞的蛋白酶活化受体2。近来研究表明,YKL-40的表达水平与哮喘的发生发展有着密切的关系^[6]。CHI3L1基因具有多个多态位点,现已发现超过200个,遍布于CHI3L1基因的全长^[7],部分CHI3L1基因变异位点最近被证实与哮喘易感性相关。随着对CHI3L1基因在哮喘中作用及机制的研究不断深入,有可能在将来为哮喘的风险提前预估提供一个新的生物指标,为哮喘的防治提供新的思路与方法。目前,CHI3L1单核苷酸多态性(SNP)主要研究对象大多数为欧美人群,国内相关哮喘基因多样性的研究相对较少。本研究拟对CHI3L1基因的SNP位点rs4950928、rs10399805和rs883125进行检测分析,为儿童哮喘的早期干预、个性化诊断和治疗寻找新的方向。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2011年1月至2013年10月确诊的0~6岁支气管哮喘患儿316例为研究对象,诊断标准依据中华医学会呼吸病分会哮喘学组2013年制定的《支气管哮喘防治指南(基层版)》^[8],其中男164例,女152例,平均年龄 2.2 ± 1.4 岁;同期选取297例无咳嗽、咳痰等呼吸道症状,无哮喘、过敏性鼻炎、特异性皮炎等过敏性疾病,且父母无过敏史的0~6岁健康儿童为对照组,其中男152例,女145例,平均年龄 2.3 ± 1.5 岁。两组儿童

相互间无血缘关系;且平均年龄和性别分布差异均无统计学意义,具有可比性。抽血前填写一般资料调查表,所有信息的采集均严格按照相应伦理规章制度执行。

1.2 主要仪器与试剂

总IgE测定采用美国Beckman公司的DXI-800化学发光仪;嗜酸性粒细胞比例测定使用日本Sysmex公司的XS-500i血细胞分析仪;YKL-40测定采用美国CUSABIO公司的ELISA试剂盒;SNP位点的检测分析使用Sequenome公司的相关反应试剂和MALDI-TOF质谱仪。

1.3 样本采集

分别采集两组研究对象2 mL外周血,其中1 mL血样采用化学发光法和流式细胞术分别检测总IgE水平和嗜酸性粒细胞比例;另外1 mL血样以4℃ 3000 rpm离心20 min分离血浆和血细胞,分离的血浆应用ELISA法检测YKL-40水平,血细胞提取基因组DNA进行质谱分析。

1.4 总IgE浓度和嗜酸性粒细胞比例测定

总IgE浓度和嗜酸性粒细胞比例测定均采用配套试剂,按照DXI-800化学发光仪和XS-500i血细胞分析仪的标准操作程序进行自动化检测。

1.5 血浆YKL-40检测

YKL-40测定采用美国CUSABIO公司的ELISA试剂盒,具体步骤按照说明书进行操作。

1.6 SNP分型检测

采用Mass ARRAY-IPLEX质谱阵列技术对CHI3L1基因的SNP位点rs10399805、rs4950928和rs883125进行检测。提取各样本血细胞基因组DNA行PCR扩增,引物序列见表1。PCR反应结束后对各样本进行纯化回收,树脂脱盐后用Nanodispenser点样,将点好样的芯片放入质谱仪中打质谱。

1.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析;不符合正态分布的计量资料采用中位数(四分位间距) $[P_{50}(P_{25}, P_{75})]$ 表示,两组间比较采用Mean-Whitney U 检验,多组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验;基因频率采用百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 SNP 位点的引物序列

SNP 位点	引物名称	引物序列 (5'→3')
rs10399805	上游	CCTCATGAAGACCTGACCCAAA
	下游	TGGATTACCAGAGGAGGGTTGA
	UEP-SEQ	CCCAAAGTTTTCAAAACTCTGC
rs4950928	上游	GCTCAGTTCCCATAAAAGG
	下游	CCAGGCCCTGTACTTCCT
	UEP-SEQ	GGGCTGGTTTGCCGCGT
rs883125	上游	CATTCTGTGTGCCTTGCTCTTCTG
	下游	TGGAGTGTATGCAACTGTAAAGC
	UEP-SEQ	CACTGGTCTTGTGACTAGCTGAA

注: UEP-SEQ 是单碱基延伸引物。

2 结果

2.1 两组血浆 YKL-40 水平的比较

哮喘组患儿血浆 YKL-40 浓度为 59.30 (34.21, 89.51) ng/mL, 显著高于对照组血浆 YKL-40 水平 [26.17 (15.18, 38.57) ng/mL] ($U=19441.5$, $P<0.001$)。

2.2 两组嗜酸性粒细胞比例和总 IgE 浓度的比较

哮喘组嗜酸性粒细胞比例 [1.52% (0.48%, 2.62%)] 与对照组 [1.58% (0.53%, 2.54%)] 比较差异无统计学意义 ($U=49051.5$, $P=0.332$); 哮喘组总 IgE 水平 [351.35 (100.93, 611.23) IU/mL] 明显高于对照组 [33.38 (19.27, 53.30) IU/mL, $U=8947$, $P<0.001$]。

2.3 CHI3L1 基因 SNP 位点在两组间的分布频率

CHI3L1 基因 SNP 位点 rs10399805、rs4950928 和 rs883125 基因型均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。rs10399805 位点在两组间的基因型和等位基因频率差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。rs4950928 位点的 CC 基因型在哮喘组中的频率低于对照组 ($P<0.01$), 而 CG 基因型频率则高于对照组 ($P<0.01$), 且 C 和 G 等位基因频率在两组间差异有统计学意义 ($P<0.001$)。rs883125 位点的 GG 基因型在哮喘组中的频率高于对照组 ($P<0.001$), 且 C 和 G 等位基因频率在两组间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2~4。

表 2 两组 CHI3L1 基因 rs10399805 位点基因型及等位基因频率比较 [例 (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		TT	CT	CC	T	C
对照组	297	21(7.1)	121(40.7)	155(52.2)	163(27.4)	431(72.6)
哮喘组	316	30(9.5)	129(40.8)	157(49.7)	189(29.9)	443(70.1)
χ^2 值		0.893	<0.001	0.251	0.188	
P 值		0.344	0.987	0.616	0.665	

表 3 两组 CHI3L1 基因 rs4950928 位点基因型及等位基因频率比较 [例 (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	CG	GG	C	G
对照组	297	217(73.1)	71(23.9)	9(3.0)	505(85.0)	89(15.0)
哮喘组	316	192(60.8)	111(35.1)	13(4.1)	495(78.3)	137(21.7)
χ^2 值		7.693	6.921	0.340	17.020	
P 值		0.006	0.009	0.527	<0.001	

表 4 两组 CHI3L1 基因 rs883125 位点基因型及等位基因频率比较 [例 (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC	CG	GG	C	G
对照组	297	211(71.0)	78(26.3)	8(2.7)	500(84.2)	94(15.8)
哮喘组	316	215(68.0)	74(23.4)	27(8.5)	504(79.7)	128(20.3)
χ^2 值		0.440	0.418	13.060	3.982	
P 值		0.508	0.518	<0.001	0.046	

2.4 CHI3L1 基因变异与哮喘各指标水平的关系

根据上述结果提示, rs4950928 和 rs883125 可能是导致儿童哮喘发作的易感因子。因此本研究对 rs4950928 和 rs883125 中多个基因型与哮喘指标之间的关系进行进一步比较研究。

血浆 YKL-40 和总 IgE 浓度在 rs4950928 位点不同基因型患儿中差异均有统计学意义, 且基因型为 GG 或 CG 的哮喘患儿血浆 YKL-40 和总 IgE 浓度均高于基因型为 CC 的患儿 (均 $P<0.05$); 而嗜酸性粒细胞比例在 rs4950928 位点不同基因型患儿间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 5。

血浆 YKL-40 水平、总 IgE 浓度和嗜酸性粒细胞比例在 rs883125 位点不同基因型患儿中差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$), 见表 6。

表 5 rs4950928 位点不同基因型患儿哮喘各指标水平的比较 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]

基因型	YKL-40 浓度 (ng/mL)	总 IgE 浓度 (IU/mL)	嗜酸性粒细胞比例 (%)
CC	56.40(28.14, 87.00)	273.39(66.82, 526.83)	1.57(0.52, 2.48)
CG	60.47(47.10, 98.93) ^a	514.98(194.91, 828.43) ^a	1.42(0.38, 2.85)
GG	68.34(61.25, 86.85) ^a	547.42(189.27, 897.22) ^a	1.68(0.47, 2.62)
H 值	6.525	25.636	0.104
P 值	0.038	<0.001	0.950

注: a 示与 CC 基因型比较, $P<0.05$ 。

表 6 rs883125 位点不同基因型患儿哮喘各指标水平的比较 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]

基因型	YKL-40 浓度 (ng/mL)	总 IgE 浓度 (IU/mL)	嗜酸性粒细胞比例 (%)
CC	57.17(34.12, 89.20)	325.48(104.36, 561.01)	1.32(0.42, 2.59)
CG	59.17(36.74, 85.24)	198.4(71.08, 532.82)	1.65(0.28, 3.08)
GG	72.71(43.40, 93.75)	599(80.57, 767.41)	1.60(0.51, 2.59)
H 值	0.292	5.115	0.125
P 值	0.864	0.078	0.939

3 讨论

哮喘是最常见的儿童慢性疾病之一, 2009~2010 年的抽样调查显示, 我国城市儿童哮喘患病率为 3.02% (95%CI: 2.97%~3.06%), 2 年哮喘现患率则为 2.32% (95%CI: 2.28%~2.37%)^[1]。哮喘是一种多基因遗传病, 其多基因遗传的方式十分复杂。本研究通过对 316 名哮喘患儿和 297 名健康儿童的 CHI3L1 基因位点 rs10399805、rs4950928 和 rs883125 进行单核苷酸多态性分析, 结果表明: CHI3L1 基因的 rs4950928 和 rs883125 多态性可能是儿童哮喘的易感因子, 而 rs10399805 可能并非儿童的哮喘易感基因。rs883125 位点的 GG 基因型可能提高携带儿童患哮喘的风险; rs4950928 的 C 等位基因可能对哮喘患儿起到了一定的保护作用, 而 G 等位基因则可能是提高哮喘风险的易感因子; 此外本研究还发现, 哮喘组血液中的总 IgE 和 YKL-40 水平明显高于对照组。

rs10399805 总共有 TT、CT 和 CC 三种基因型, 本研究中这三个基因型频率在哮喘患儿和健康儿童中的分布差异无统计学意义。针对 rs10399805 作用的研究目前尚存争议。在 2009 年针对韩国儿童的调查显示, rs10399805 T 等位基因在过敏患者中相比正常人有显著提高, 同时伴有 YKL-40 水

平的升高^[9]。针对欧美人群的研究则表明, 尽管 rs10399805 T 等位基因仍能提高 YKL-40 水平, 然而该位点与过敏之间的联系仍有待确认^[10]。我国学者 2011 年最新研究报告则显示, rs10399805 甚至与外周血 YKL-40 水平的提高无明显联系^[11]。由此可知, rs10399805 是否是哮喘的易感基因, 其在哮喘中所起的作用仍是一个未知数, 仍有待研究。

rs883125 总共 CC、CG 和 GG 三种基因型, 在本研究中哮喘患儿 GG 基因型的频率远远高于健康儿童, 表明 GG 基因型可能提高携带儿童患哮喘的风险。在哮喘患者 rs883125 位点各基因型的对比中, 其 YKL-40、总 IgE 水平和嗜酸性粒细胞比例无明显差异, 这表明 G 等位基因对于 YKL-40 和总 IgE 的升高并无明显影响, 因此其对疾病的严重程度影响可能与 C 等位基因并无差别。

rs4950928 位于 CHI3L1 基因的启动子上, 其变异与一系列的疾病有关, 其可能是哮喘的易感基因之一^[12-13], 然而具体作用方式仍有待于进一步的研究。Rathcke 等^[14]针对 6514 名丹麦成人样本的研究发现 rs4950928 G 等位基因是哮喘的易感因子。有学者针对 G 等位基因对于基因表达的作用进行了深入的研究, 发现在荧光素酶报告基因检测实验中, 带有 rs4950928、-131G 的基因, 相

比-131C具有更高的转录活性,同时在外周血中也检测出了更高的相应mRNA^[15]。本研究结果表明,rs4950928的CC基因型在哮喘组中的频率和对照组相比下降了12.3%,而CG基因型反而上升了11.2%,两种基因型频率的改变均具有统计学意义。本研究又比较了不同基因型患儿嗜酸性粒细胞比例、YKL-40和总IgE的水平,结果发现,除了嗜酸性粒细胞比例在3个基因型中分布基本一致外,携带CC基因型的哮喘患儿均伴随着相对较低的YKL-40和总IgE水平,提示在儿童人群中,rs4950928的C等位基因可能对哮喘起到的保护作用,而G等位基因则是哮喘的易感因子。

综上所述,本研究发现CHI3L1基因rs4950928和rs883125这两个SNP位点可能是儿童哮喘的易感基因,该结果可为儿童哮喘的早期预防、个体化诊断和治疗寻找新的方法和依据。

【参 考 文 献】

- [1] 全国儿科哮喘协作组,中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所.第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J].中华儿科杂志,2013,51(10):729-735.
- [2] 黄东明,肖晓雄,付四毛,等.中山地区乡镇和城区3~14岁儿童喘息和慢性咳嗽问卷调查分析[J].中国当代儿科杂志,2014,16(7):734-739.
- [3] Devries A, Vercelli D. Epigenetics of human asthma and allergy: promises to keep[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2013, 31(3): 183-189.
- [4] Zhao G, Lin X, Zhou M, et al. Association between CC10 +38A/G polymorphism and asthma risk: a meta-analysis[J]. Pak J Med Sci, 2013, 29(6): 1439-1443.
- [5] Hong JH, Hong JY, Park B, et al. Chitinase activates protease-activated receptor-2 in human airway epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39(5): 530-535.
- [6] Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, et al. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma[J]. N Engl J Med, 2007, 357(20): 2016-2027.
- [7] Kjaergaard AD, Johansen JS, Nordestgaard BG, et al. Genetic variants in CHI3L1 influencing YKL-40 levels: resequencing 900 individuals and genotyping 9000 individuals from the general population[J]. J Med Genet, 2013, 50(12): 831-837.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会,中华医学会全科医学分会.中国支气管哮喘防治指南(基层版)[J].中华结核和呼吸杂志,2013,36(5):331-336.
- [9] Sohn MH, Lee JH, Kim KW, et al. Genetic variation in the promoter region of chitinase 3-like 1 is associated with atopy[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(6): 449-456.
- [10] Fontana RJ, Litman HJ, Dienstag JL, et al. For the HALT-C Trial Group YKL-40 genetic polymorphisms and the risk of liver disease progression in patients with advanced fibrosis due to chronic hepatitis C[J]. Liver Int, 2012, 32(4): 665-674.
- [11] Zheng JL, Lu L, Hu J, et al. Genetic polymorphisms in chitinase 3-like 1 (CHI3L1) are associated with circulating YKL-40 levels, but not with angiographic coronary artery disease in a Chinese population[J]. Cytokine, 2011, 54(1): 51-55.
- [12] Konradsen JR, James A, Nordlund B, et al. The chitinase-like protein YKL-40: a possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(2): 328-335.
- [13] Ortega H, Prazma C, Suruki RY, et al. Association of CHI3L1 in African-Americans with prior history of asthma exacerbations and stress[J]. J Asthma, 2013, 50(1): 7-13.
- [14] Rathcke CN, Holmkvist J, Husmoen LL, et al. Association of polymorphisms of the CHI3L1 gene with asthma and atopy: a populations-based study of 6514 Danish adults[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6106.
- [15] Yamamori H, Hashimoto R, Ohi K, et al. A promoter variant in the chitinase 3-like 1 gene is associated with serum YKL-40 level and personality trait[J]. Neurosci Lett, 2012, 513(2): 204-208.

(本文编辑:万静)