

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.03.008

论著·临床研究

哮喘患儿 ORMDL3 基因多态性与溶血卵磷脂及载脂蛋白 B 的关系

王冰洁¹ 王桂兰¹ 陈德晖² 王文祥³ 黄娟¹ 容嘉妍¹ 刘翔腾¹ 杨赛¹

(1. 南方医科大学附属中山博爱医院小儿呼吸科, 广东 中山 528400;

2. 广州医科大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510000;

3. 南方医科大学附属中山小榄人民医院儿科, 广东 中山 528400)

[摘要] **目的** 探讨哮喘患儿 ORMDL3 基因多态性与溶血卵磷脂(Lyso-PC)及载脂蛋白 B(apoB)的关系。**方法** 选取 2010 年 1 月至 2012 年 12 月诊断为支气管哮喘的 300 例患儿为哮喘组,另选取同期诊断为上呼吸道感染的 298 例患儿为对照组。ELISA 法检测两组患儿血清中 Lyso-PC 和 apoB 水平;TaqMan 探针法进行基因型分析。**结果** 哮喘组 Lyso-PC、apoB 水平明显高于对照组($P<0.01$);哮喘组 ORMDL3 基因 rs12603332 位点不同基因型患儿 Lyso-PC、apoB 水平亦显著高于对照组($P<0.01$);CC 基因型哮喘患儿 Lyso-PC、apoB 水平明显高于 CT 和 TT 基因型患儿($P<0.01$)。**结论** Lyso-PC 及 apoB 可能干预哮喘发生的病理过程;血清中高 Lyso-PC、apoB 水平可能与哮喘易感基因 ORMDL3 多态性 rs12603332 位点共同作用导致儿童哮喘的发生。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 241-244]

[关键词] ORMDL3 基因;基因多态性;溶血卵磷脂;载脂蛋白 B;哮喘;儿童

Association of ORMDL3 single nucleotide polymorphisms with lysophosphatidylcholine and apolipoprotein B levels in children with asthma

WANG Bing-Jie, WANG Gui-Lan, CHEN De-Hui, WANG Wen-Xiang, HUANG Juan, RONG Jia-Yan, LIU Xiang-Teng, YANG Sai. Department of Pediatric Respiratory Medicine, Zhongshan Boai Hospital of Southern Medical University, Zhongshan, Guangdong 528400, China (Wang G-L, Email: 53046697@qq.com)

Abstract: Objective To study the association of ORMDL3 single nucleotide polymorphisms (SNP) with lysophosphatidylcholine (LysoPC) and apolipoprotein B (apoB) levels. **Methods** A total of 300 children diagnosed with bronchial asthma between January 2010 and December 2012 were selected for the asthma group, and 298 children diagnosed with upper respiratory tract infection in the same period were selected for the control group. Serum LysoPC and apoB levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Genotype analysis was performed using the TaqMan probe. **Results** LysoPC and apoB levels were significantly higher in the asthma group than in the control group ($P<0.01$). Among children with various genotypes of ORMDL3 gene at locus rs12603332, the asthma group had significantly higher LysoPC and apoB levels than the control group ($P<0.01$). Among the children with asthma, those with CC genotype had significantly higher LysoPC and apoB levels than those with CT and TT genotypes ($P<0.01$). **Conclusions** LysoPC and apoB may intervene in the pathological process of asthma. Pro-inflammatory gene ORMDL3 SNP rs12603332 may be associated with high LysoPC and apoB levels, which leads to the occurrence of childhood asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(3): 241-244]

Key words: ORMDL3 gene; Gene polymorphism; Lysophosphatidylcholine; Apolipoprotein B; Asthma; Child

支气管哮喘是由多种细胞,包括炎性细胞、气道结构细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。脂质在哮喘相关病理过程中起到一定的作

用,有学者认为饮食中脂肪与哮喘发病有关联,指出气道高反应性与饮食中反式脂肪酸、人造奶油和 ω -6 多聚不饱和脂肪酸有关^[1];患特应性疾

[收稿日期] 2014-07-09; [接受日期] 2014-09-30

[作者简介] 王冰洁,女,硕士研究生。

[通信作者] 王桂兰,女,主任医师。

病婴儿其母乳中含较多的亚油酸和较少的多不饱和脂肪酸^[2]；多不饱和脂肪酸含量丰富的食品引起哮喘患者气道反应性增强^[3]；牛奶去脂后，引起患者肺部的气体交换明显增强^[4]；哮喘患者血中溶血卵磷脂（Lyso-PC）的含量与气道高反应性呈正相关^[5]；Lyso-PC可能会导致肺损伤，可增加毛细血管通透性，改变肺表面活性剂性质，还可诱导肥大细胞分泌和气道高反应^[5-6]；国内有研究显示支气管哮喘发作期血清载脂蛋白A（apoA）明显升高，载脂蛋白B（apoB）下降，与对照组比较差异变化显著^[7]；Gabriele等^[8]证实了高水平的载脂蛋白AI（apoAI）与支气管哮喘及过敏性鼻炎有明显的相关性，并揭示了apoB水平升高与非过敏性喘息及炎症有关。

全基因组关联研究报道显示，ORMDL3基因是迄今为止发现的与哮喘关联最有充分证据的基因^[9-10]，并且多项研究结果显示，ORMDL3基因仅与儿童期起病的哮喘相关^[11]。在前期研究中，本课题组已经发现ORMDL3基因单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms, SNPs）rs12603332位点可能与广东地区儿童哮喘相关；SNP rs12603332的CC基因型为儿童哮喘发病的危险因素^[12]。本研究旨在探索广东地区儿童哮喘发病显著相关的ORMDL3基因SNP rs12603332位点与Lyso-PC及apoB之间的相关性，为脂质、基因与哮喘的关系研究开拓新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2010年1月至2012年12月于南方医科大学附属中山博爱医院、南方医科大学附属中山小榄人民医院、广州医科大学第一附属医院三所三级甲等医院诊断为支气管哮喘的300例0~14岁的广东籍患儿为研究对象，其中男163例，女137例，平均年龄 6.2 ± 2.7 岁，均为既往已诊断明确，处于非哮喘急性发作期，且为哮喘控制或部分控制患儿，诊断及控制等级分级参照《儿童支气管哮喘诊断与防治指南（2008年版）》^[13]。另随机选取于南方医科大学附属中山博爱医院小儿呼吸科就诊的0~14岁患普通上呼吸道感染的广东籍患儿298例为对照组，其中男154例，女144例，

平均年龄 5.9 ± 2.8 岁；对照组患儿发育正常、无肺部症状、既往过敏原检测结果阴性、无过敏反应家族史及个人过敏反应疾病史。哮喘组与对照组患儿在年龄、性别方面比较差异无统计学意义，均排除了高血压、糖尿病及心脑血管疾病。本研究经南方医科大学伦理委员会审查批准，并由家长签署了知情同意书。

1.2 血清 Lyso-PC 及 apoB 水平检测

采集两组患儿空腹静脉血2 mL，以4000 rpm离心5 min，取血清，采用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测血清Lyso-PC和apoB水平，人溶血磷脂酰胆碱酶联免疫分析试剂盒和人apoB酶联免疫分析试剂盒均购自行知生物有限公司。

1.3 TaqMan 探针法行基因分型

抽取对照组及哮喘组空腹静脉血3 mL，加入0.02 g/mL乙二胺四乙酸（EDTA）0.4 mL，低渗法分离白细胞，酚-氯仿提取基因组DNA。ORMDL3 rs12603332位点通过TaqMan（Applied Biosystems）探针法进行SNP基因型分析，基因型的分析与引物设计均由上海靶向分子医学研究所完成。rs12603332引物序列：上游5'-GAGACTTTCGTGTGACTATG-3'；下游5'-GCAGGTTATGAAACCACATC-3'。PCR反应体系（10 μ L），包括TaqMan® Genotyping Master Mix（内含FAM和VIC荧光标记物标记的探针和2条引物）5 μ L、TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix（内含DNA聚合酶、dNTP、Mg²⁺等）0.2 μ L、灭菌蒸馏水2.8 μ L、DNA 2 μ L。PCR反应条件：95℃预变性10 min；95℃变性15 s，60℃退火60 s，共40个循环。反应在ABI9700 PCR扩增仪（美国Life Technologies公司）中进行扩增，然后在ABI7900实时荧光定量PCR仪（美国Life Technologies）中进行终点读板。反应结果由ABI SDS 2.3软件判断得出ORMDL3基因SNP位点rs12603332分为CC、CT及TT三个基因型。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用方差分析，组间两两比较采用LSD- t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 Lyso-PC 及 apoB 水平比较

哮喘组血清 Lyso-PC 和 apoB 水平均明显高于对照组 ($P<0.01$), 见表 1。

2.2 两组不同基因型患儿血清 Lyso-PC 及 apoB 水平比较

哮喘组 ORMDL3 基因 SNP rs12603332 位点不同基因型患儿血清 Lyso-PC 和 apoB 水平均显著高于对照组 ($P<0.01$), 见表 2。

2.3 不同基因型哮喘患儿血清 Lyso-PC 及 apoB 水平比较

rs12603332 位点不同基因型哮喘患儿的血

清 Lyso-PC 和 apoB 水平差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。其中 CC 基因型的血清 Lyso-PC 和 apoB 水平显著高于其余基因型 ($P<0.05$), 提示携带 CC 基因型的患儿血清 Lyso-PC 和 apoB 水平显著升高。见表 3。

表 1 两组血清 Lyso-PC 及 apoB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Lyso-PC (pg/mL)	apoB (μg/mL)
对照组	298	38 ± 5	613 ± 59
哮喘组	300	55 ± 5	931 ± 117
<i>t</i> 值		-40.046	-41.897
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

表 2 两组 ORMDL3 基因 rs12603332 位点不同基因型患儿血清 Lyso-PC 及 apoB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Lyso-PC (pg/mL)			apoB (μg/mL)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT
对照组	38 ± 5 (<i>n</i> =138)	38 ± 5 (<i>n</i> =137)	38 ± 5 (<i>n</i> =23)	613 ± 59 (<i>n</i> =138)	612 ± 58 (<i>n</i> =137)	619 ± 63 (<i>n</i> =23)
哮喘组	55 ± 5 (<i>n</i> =171)	45 ± 9 (<i>n</i> =108)	46 ± 10 (<i>n</i> =21)	932 ± 118 (<i>n</i> =171)	753 ± 181 (<i>n</i> =108)	768 ± 185 (<i>n</i> =21)
<i>t</i> 值	-28.756	-25.154	-11.017	-30.756	-26.128	-10.321
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 rs12603332 位点不同基因型哮喘患儿血清 Lyso-PC 和 apoB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	Lyso-PC (pg/mL)	apoB (μg/mL)
CC	171	55 ± 5	932 ± 118
CT	108	45 ± 9 ^a	753 ± 181 ^a
TT	21	46 ± 10 ^a	768 ± 185 ^a
<i>F</i> 值		67.238	64.010
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: a 示与 CC 基因型比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

1997 年, Black 等^[14]证实哮喘的发生和发展与饮食中多元不饱和脂肪酸 (PUFAs) 的增加以及饱和脂肪酸的消耗减少密切相关, 提出 ω-6 多聚不饱和脂肪酸在调节免疫反应以及炎症反应中起到重要的作用。随后, 各国学者开始对脂质与哮喘的关系作出了研究。国外研究显示, 磷脂酶 A2 (PLA2) 在细胞膜上水解产生花生四烯酸 (AA) 及 Lyso-PC, AA 作为增强血管及支气管脂质形成

的前炎症介质, 在支气管哮喘的炎症反应过程中起到重要的推动作用; Lyso-PC 除了会导致肺损伤, 增加毛细血管通透性, 改变肺表面活性物质, 诱导肥大细胞分泌和增加气道高反应性以外, 还可降低支气管平滑肌上 β 肾上腺素敏感度^[15]; 另外, Lyso-PC 可增强细胞因子诱导干扰素 γ 在人 T 淋巴细胞中的表达以及生长因子基因在内皮细胞中的表达^[16-17]。以上研究结果说明, Lyso-PC 可诱发机体急性和慢性炎症并在支气管哮喘病理学改变中起重要的作用。本研究表明, 支气管哮喘患儿血清 Lyso-PC 水平明显较非支气管哮喘患儿高, 进一步证实了 Lyso-PC 在哮喘的发生、发展中起着重要调控作用。近期对心血管疾病的研究报道显示, 载脂蛋白在炎症疾病中的改变比血浆脂质指标更为敏感^[18]。脂质运输系统可分为两个子类: apoB 系统, 包括极低密度脂蛋白 (VLDL)、中间密度脂蛋白以及低密度脂蛋白胆固醇; 载脂蛋白 AI (apoAI) 系统, 包括高密度脂蛋白 (HDL-C)。apoB 通过抑制内生性纤维蛋白溶解以及刺激细胞因子的产生和刺激炎症反应的发生从而增强纤维

蛋白溶解系统作用, apoB 与非过敏性喘息及炎症有关^[8]。本研究结果显示, 哮喘患儿血清 apoB 水平明显高于对照组, 说明 apoB 可能干预哮喘发生的病理过程。哮喘发病与免疫球蛋白、补体、凝血系统成分及细胞周围蛋白等因素有关, 说明各种蛋白在一定程度上参与发病过程中体液与细胞相互作用的介导, 这点可解释哮喘患儿 apoB 水平升高的原因。Lyso-PC 及 apoB 对哮喘发病的具体干预机制有待进一步研究。

哮喘基因也是近年来研究的热点, ORMDL3 基因是与儿童哮喘发生最有关联的基因^[10], 目前国内外对 ORMDL3 的具体功能及作用机制了解甚少, 有研究发现 ORMDL 蛋白通过与鞘类脂质合成的限速酶结合形成保守的 SPOTS 复合物下调鞘类脂质代谢, 当病理或生理状态下鞘类脂质合成中断时, 可通过磷酸化 ORMDL 蛋白减少 SPOTS 复合物的形成, 从而下调 ORMDL 对鞘类脂质合成的抑制作用, 使鞘类脂质代谢达到动态平衡^[19], 提示 ORMDL3 基因可能影响哮喘患儿脂质代谢水平。本研究对与儿童哮喘显著相关的 ORMDL3 基因 SNP rs12603332 位点 CC、CT、TT 基因型的患儿进行血清 Lyso-PC 和 apoB 水平分析, 发现哮喘患儿 CC 基因型血清 Lyso-PC 和 apoB 水平较对照组明显增高, 且携带 CC 基因型的哮喘患儿血清 Lyso-PC 和 apoB 水平较其他基因型患儿增高。提示血清中高 Lyso-PC 和 apoB 水平可能与哮喘易感基因 ORMDL3 SNP rs12603332 位点共同作用导致儿童哮喘的发生, ORMDL3 表达水平增高可能导致脂质代谢的紊乱进而引发哮喘, 具体病理机制值得进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Wood LG, Garg ML, Gibson PG. A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2010, 127(5): 1133-1139.
- [2] Soto-Ramírez N, Karmaus W, Zhang H, et al. Fatty acids in breast milk associated with asthma-like symptoms and atopy in infancy: a longitudinal study[J]. *Asthma*, 2012, 49(9): 926-934.
- [3] Kim JH, Ellwood PE, Asher MI. Diet and asthma: looking back, moving forward[J]. *Respir Res*, 2009, 10: 49.
- [4] Thiara G, Goldman RD. Milk consumption and mucus production in children with asthma[J]. *Can Fam Physician*, 2012, 58(2): 165-166.
- [5] Chaffee RJ, Wilensky RL, Mohler ER 3rd. Recent developments with lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitors[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2010, 12(1): 43-47.
- [6] Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1048-1053.
- [7] 李瑞慧, 陈斌, 林章树. 支气管哮喘发作对心脏的影响[J]. *心血管康复医学杂志*, 2002, 9(5): 26-28.
- [8] Nagel G, Weiland SK, Rapp K, et al. Association of apolipoproteins with symptoms of asthma and atopy among school children[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009, 149(3): 259-266.
- [9] Kang MJ, Yu HS, Seo JH, et al. GSDMB/ORMDL3 variants contribute to asthma susceptibility and eosinophil-mediated bronchial hyperresponsiveness[J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(9): 954-959.
- [10] Yang FF, Huang Y, Li QB, et al. Single nucleotide polymorphisms in the ORM1-like 3 gene associated with childhood asthma in a Chinese population[J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(4): 4646-4653.
- [11] Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 470-473.
- [12] 王桂兰, 王冰洁, 陈德晖, 等. 支气管哮喘患儿 ORMDL3 单核苷酸多态性对其发病的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(4): 26-29.
- [13] 中华医学会儿科分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 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.
- [14] Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection?[J]. *Eur Respir*, 1997, 10(1): 6-12.
- [15] Kume H, Ito S, Ito Y, et al. Role of lysophosphatidylcholine in the desensitization of β -adrenergic receptors by Ca^{2+} sensitization in tracheal smooth muscle[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(3): 291-298.
- [16] Nishi E, Kume N, Ueno YH, et al. Lyso-phosphatidylcholine enhances cytokine-induced interferon gamma expression in human T lymphocytes[J]. *Circ Res*, 1998, 83(5): 508-515.
- [17] Kume N, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(2): 907-911.
- [18] Thompson A, Danesh J. Associations between apolipoprotein B, apolipoprotein AI, the apolipoprotein B/AI ratio and coronary heart disease: a literature-based meta-analysis of prospective studies[J]. *Intern Med*, 2006, 259(5): 481-492.
- [19] Jin R, Xu HG, Yuan WX, et al. Mechanisms elevating ORMDL3 expression in recurrent wheeze patients: role of Ets-1, p300 and CREB[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1174-1183.

(本文编辑: 万静)