

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.08.010

论著 · 临床研究

ZNF365 基因多态性与儿童支气管哮喘的相关性

黄娟 赵红玲 程衍杨

(咸宁市中心医院儿科, 湖北 咸宁 437100)

[摘要] **目的** 探讨我国中部湖北地区儿童 ZNF365 基因的两个 SNP 位点 (rs2393903 和 rs10995251) 的多态性与支气管哮喘及其临床特点的关系。**方法** 采用病例-对照的研究方法, 选取湖北地区 221 例支气管哮喘患儿和 243 例同时期体检正常的儿童作为研究对象, 利用限制性片段长度多态性分析的方法检测两个 SNP 位点的多态性分布。**结果** 哮喘患儿中 SNP rs2393903 位点的 3 种基因型 (GG、GA、AA) 分布及等位基因频率与正常对照组相比差异均无统计学意义; 而 SNP rs10995251 位点的基因型 (CC、CT、TT) 以及等位基因频率与正常对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$), C 等位基因为风险因子 ($OR=1.380$)。在哮喘患儿中 SNP rs10995251 位点 CC 基因型患儿血清免疫球蛋白 E (IgE) 的水平高于 TT 基因型患儿 ($P<0.05$)。**结论** ZNF365 基因 SNP rs10995251 位点的多态性与我国中部湖北地区儿童支气管哮喘的易感性相关; 且该位点的多态性可能影响患儿血清 IgE 水平。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(8): 811-814]

[关键词] 支气管哮喘; ZNF365 基因; 易感性; 免疫球蛋白 E; 儿童

Association between ZNF365 gene polymorphisms and bronchial asthma in children

HUANG Juan, ZHAO Hong-Ling, CHENG Yan-Yang. Department of Pediatrics, Xianning Central Hospital, Xianning, Hubei 437100, China (Zhao H-L, Email: hbzhaohl@sina.com)

Abstract: Objective To study the association of single nucleotide polymorphisms (SNP) (rs2393903 and rs10995251) in ZNF365 gene with bronchial asthma and its clinical characteristics in Han Chinese children in Hubei, China. **Methods** A total of 221 children with bronchial asthma and 243 normal children, all of whom were from Hubei, were recruited to carry out a case-control study. The genotype and allele frequencies of two SNPs in ZNF365 gene were determined using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique. **Results** There were no significant differences in the distribution of three genotypes (GG, GA, AA) and allele frequency in SNP rs2393903 between the asthma and control groups ($P>0.05$). However, there were significant differences in the distribution of three genotypes (CC, CT, TT) and allele frequency in SNP rs10995251 between the asthma and control groups ($P<0.05$); C allele was a risk factor ($OR=1.380$). The asthmatic children with CC genotype of SNP rs10995251 had a significantly higher serum level of total immunoglobulin E (IgE) than those with TT genotype ($P<0.05$). **Conclusions** The SNP rs10995251 in ZNF365 gene is associated with the susceptibility to bronchial asthma in children in Hubei, China, and the SNP may affect the level of serum IgE in these children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(8): 811-814]

Key words: Bronchial asthma; ZNF365 gene; Susceptibility; Immunoglobulin E; Child

支气管哮喘 (以下简称哮喘) 是一种有多种细胞和炎性介质以及细胞因子参与的, 以慢性气道炎症和气道高反应性为主要特征的变态反应性疾病。随着人们生活环境以及生活模式的改变, 近些年来儿童哮喘在全球范围内有逐渐增加的趋势^[1]。儿童哮喘受环境因素的影响, 又有明显的遗传倾向, 已有研究表明多种基因与哮喘的易感性相关^[2]。哮喘与特应性皮炎均属于变态反应性疾病, 且特应性皮炎常伴随哮喘的发生^[3]。国内外均有研究利用全基因组关联 (GWAS) 发现 ZNF365 基因

势^[1]。儿童哮喘受环境因素的影响, 又有明显的遗传倾向, 已有研究表明多种基因与哮喘的易感性相关^[2]。哮喘与特应性皮炎均属于变态反应性疾病, 且特应性皮炎常伴随哮喘的发生^[3]。国内外均有研究利用全基因组关联 (GWAS) 发现 ZNF365 基因

[收稿日期] 2015-04-06; [接受日期] 2015-06-05

[作者简介] 黄娟, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 赵红玲, 女, 副主任医师。

与特应性皮炎相关^[4-5], 但该基因的多态性与哮喘的相关性未见报道。本研究以我国中部湖北地区哮喘患儿为研究对象, 探讨 ZNF365 基因 SNP 位点(rs2393903 和 rs10995251) 多态性与哮喘及其临床特点的相关性, 以进一步揭示哮喘的遗传学发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2010年7月至2014年6月在我院儿科住院治疗的哮喘患儿221例纳入本研究作为哮喘组, 年龄1岁1个月至9岁3个月(平均年龄 4 ± 3 岁), 其中男119例(53.8%), 女102例(46.2%)。同时期体检正常的243名儿童作为对照组, 年龄1岁10个月至10岁(平均年龄 5 ± 3 岁), 其中男136例(55.9%), 女107例(44.1%)。两组在年龄以及性别比例方面的差异无统计学意义(分别 $P=0.647$ 、 0.214)。两组儿童均来自我国中部湖北地区。

哮喘组的入选标准:(1)哮喘的诊断标准符合中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的哮喘诊断与防治指南^[6];(2)排除先天性肺部疾病、自身免疫性疾病、遗传性疾病等。本研究得到受试者家属知情同意以及我院医学伦理委员会的批准。

1.2 ZNF365 基因多态性分析

两组儿童均抽取静脉血1mL, 利用酚氯仿抽提乙醇沉淀的方法提取基因组DNA。以DNA为模版, 利用引物F1: TCAGGCTGACAGTGCAAACTATG, R1: CCTGGACACACAAACATGCAT 扩增含有SNP(rs2393903)的片段; 利用引物F2: CTCCAAGATATTGGCAACTCACTATGG 和 R2: CAGACATCATCGATGGTCACCAATG 扩增含有SNP(rs10995251)的片段。PCR总反应体系为25 μ L, 含有10倍PCR反应缓冲液(含Mg离子)2.5 μ L, 10 mM dNTP混合液1 μ L, 10 μ M引物各1 μ L, TAKARA公司Taq酶1 U; 反应条件: 94℃ 3 min 预变性; 94℃ 30 s 变性; 54℃ 30 s 退火, 72℃ 30 s 延伸, 共34个循环; 最后72℃ 5 min 延伸。分别取5 μ L扩增的产物利用内切酶NdeI(识别酶切位点CATATG, NEB公司)以及HaeIII(识

别位点GGCC, NEB公司)进行酶切, 然后利用3%琼脂糖电泳分析。

1.3 临床资料的收集

临床资料包括患儿性别、年龄、实验室检查结果(外周血淋巴细胞总数、总IgE水平以及中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的比例等)。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行数据的统计分析。频率计数法计算哮喘组和对照组基因型和等位基因频率, 以频数和百分比表示, 利用Hardy-Weinberg遗传平衡定律检验。各组间基因型频率分布和等位基因频率分布比较采用 χ^2 检验。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间均值的比较采用方差分析, 多组间的两两比较采用SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF365 基因两个 SNP 位点基因型的确定及频率分布

哮喘组和对照组均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律($P>0.05$), 说明两组具有群体代表性。ZNF365基因两个SNP位点多态性确定如图1所示: SNP rs2393903位点的3种基因型为GG、AA、AG; SNP rs10995251位点的3种基因型为CC、TT、CT。含有SNP rs2393903位点的PCR产物经酶切以后GG基因型显示168 bp大小的一条电泳带, AG基因型显示168 bp和144 bp的两条电泳带, AA基因型为144 bp的一条电泳带。SNP rs10995251位点片段酶切CC基因型酶切完全, 显示一条电泳带(148 bp), TT基因型不被酶切, 显示一条174 bp的电泳带, CT基因型则酶切不完全(174 bp和148 bp两条带)。

χ^2 检验显示, 哮喘组患儿ZNF365基因SNP rs2393903位点的3种基因型与对照组相比差异无统计学意义($P=0.489$)。而SNP rs10995251位点的3种基因型与对照组相比差异具有统计学意义($P=0.034$), 等位基因频率差异也具有统计学意义($P=0.015$), C等位基因为风险因子($OR=1.380$), 携带CC基因型的人群患哮喘的风险是TT基因型人群的1.981倍, 见表1。

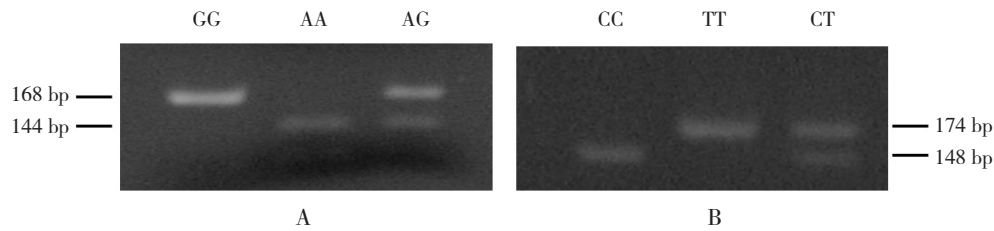


图 1 ZNF365 基因两个 SNP 位点基因型 A: SNP 位点 rs2393903 的 3 种基因型: GG、AA、AG; B: SNP 位点 rs10995251 的 3 种基因型: CC、TT、CT。

表 1 ZNF365 基因两个 SNP 位点基因型频率分布 [n (%)]

组别	例数	rs2393903				rs10995251			
		GG	AG	AA	G	CC	CT	TT	C
对照组	243	70(28.8)	89(36.6)	84(34.6)	229(47.1)	43(17.7)	129(53.1)	71(29.2)	215(44.2)
哮喘组	221	75(33.9)	76(34.4)	70(31.7)	226(51.1)	60(27.1)	111(50.2)	50(22.7)	231(52.3)
χ^2 值			1.429		1.491		6.773		5.971
OR(95%CI)		1.286 (0.816~2.026)	1.025 (0.659~1.592)	1.000	1.174 (0.907~1.520)	1.981 (1.163~3.377)	1.222 (0.785~1.901)	1.000	1.380 (1.066~1.787)
P 值			0.489		0.222		0.034		0.015

2.2 ZNF365 基因多态性与哮喘患儿临床特点的相关性

对 SNP rs10995251 位点的 3 种基因型患儿间主要临床指标的差异进行统计显示, 不同基因型的患儿间血清总 IgE 含量差异有统计学意义

($P=0.036$), 其中 CC 基因型患儿总 IgE 水平明显高于 TT 基因型的患儿 ($P=0.014$), 见表 2。但该 SNP 的多态性与外周血淋巴细胞总数、中性粒细胞比例以及嗜酸性粒细胞比例的水平不相关 (表 2)。

表 2 ZNF365 基因多态性与哮喘患儿临床特点的相关性 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	淋巴细胞总数 ($\times 10^9/L$)	总 IgE (IU/mL)	中性粒细胞比例 (%)	嗜酸性粒细胞比例 (%)
CC	60	1.7 ± 1.1	472 ± 375	53 ± 16	6.6 ± 2.5
CT	111	1.9 ± 1.3	457 ± 333	57 ± 16	6.2 ± 2.0
TT	50	1.7 ± 1.3	439 ± 355^a	55 ± 16	6.3 ± 2.4
F 值		0.396	3.638	0.845	2.344
P 值		0.669	0.036	0.437	0.118

注: a 示与 CC 基因型患儿比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

哮喘是儿童常见的一种由 T 细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞以及支气管上皮细胞等多种细胞和细胞组分共同参与的慢性呼吸道疾病, 并且哮喘反复发作, 严重影响儿童的健康和生活, 2013 年我国儿科哮喘协作组进行的全国性的儿童哮喘患病率调查显示我国儿童哮喘的发病率存在上升的

趋势^[1]。哮喘作为一种多基因复杂性的疾病, 其发病与许多基因和环境因素有关, 目前全基因组关联研究发现 200 多个与哮喘相关的基因, 且部分基因在多个人群中得到了验证^[2]。

ZNF365 基因定位于 10 号染色体 q21.2 区域, 编码锌指蛋白 365。锌指蛋白是一类可以通过结合锌离子、自身折叠成手指结构的一类转录因子蛋白, 在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育等方面具有重要的作用^[7]。近年来的研究发现特异

性的锌指蛋白可参与疾病相关基因的表达调控。国内外均有研究组发现 ZNF365 与特应性皮炎相关^[4-5]；且有研究发现该基因还与小柳原田（Vogt-Koyanagi-Harada, VKH）^[8]、克罗恩病^[9]以及乳腺癌^[10]的易感性相关。

本研究发现 SNP rs10995251 位点与小儿哮喘的易感性相关，C 等位基因为风险因子（ $OR=1.380$ ），携带 CC 基因型的人群患哮喘的风险是携带 TT 基因型人群的 1.981 倍。因 ZNF365 蛋白为转录因子蛋白^[7]，推测该位点可能影响该基因的表达水平，进而导致调控的下游基因表达的改变。该结论需要进一步在细胞水平进行验证，但通过该结果可推测这两种变态反应性疾病可能存在相同的致病机制。Sun 等^[5]研究人员发现 ZNF 基因 SNP rs2393903 位点与特应性皮炎的易感性相关，G 等位基因为风险因素，但本研究结果发现该位点与儿童哮喘的易感性不存在相关性，说明两种疾病间的致病机制存在一定的差异。

哮喘患儿一般具有气道高反应性、血清总 IgE 水平以及嗜酸性粒细胞比例增高等现象^[6]。本研究统计分析了与哮喘相关的 SNP rs10995251 位点多态性与哮喘患儿外周血淋巴细胞总数、IgE 以及中性细胞和嗜酸性粒细胞的比例等指标的相关性，结果发现该 SNP 位点的多态性与哮喘患儿血清总 IgE 水平相关，具体的机制需要进一步的研究。

以上的研究结果表明，ZNF365 基因 SNP rs10995251 位点的多态性与湖北中部地区儿童哮喘的易感性相关，该结论对进一步认识哮喘的遗传学致病机制提供了一定的依据。但本研究仍存在样本量较少的局限性，应进行多地区、多种族

的大样本分析，结论才更可靠；另外，基因多态性是否影响 ZNF365 水平，进而调控下游基因导致疾病发生的机制有待下一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 全国儿科哮喘协作组. 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): 729-732.
- [2] Klaus B, Patrick S, Kasper N, et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations[J]. Nat Genet, 2014, 46(1): 51-55.
- [3] 谢瑾玉, 董竞成. 哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎的共性与个性[J]. 国际呼吸杂志, 2005, 25(4): 298-300.
- [4] Tomomitsu H, Atsushi T, Michiaki K, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population[J]. Nat Genet, 2012, 44(11): 1222-1227.
- [5] Sun LD, Xiao FL, Li Y, et al. Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Chinese Han population[J]. Nat Genet, 2011, 43(7): 690-695.
- [6] 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.
- [7] Zhang Y, Park E, Kim CS, et al. ZNF365 promotes stalled replication forks recovery to maintain genome stability[J]. Cell Cycle, 2013, 12(17): 2817-2828.
- [8] Hou S, Du L, Lei B, et al. Genome-wide association analysis of Vogt-Koyanagi-Harada syndrome identifies two new susceptibility loci at 1p31.2 and 10q21.3[J]. Nat Genet, 2014, 46(9): 1007-1011.
- [9] Yang SK, Hong M, Choi H, et al. Immunochip analysis identification of 6 additional susceptibility loci for Crohn's disease in Koreans[J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(1): 1-7.
- [10] Lindstrom S, Thompson DJ, Paterson AD, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with both mammographic density and breast cancer risk [J]. Nat Commun, 2014, 5: 5303.

（本文编辑：邓芳明）