

白介素 10 和白介素 17 基因启动子区多态性位点与儿童哮喘的相关性研究

魏 波 朱莉莉 邓丁芳

(中国兵器 206 研究所职工医院儿科 陕西 西安 710100)

摘要 目的:探讨 IL-10 基因启动子区 -627A/C 和 IL-17 基因启动子 -152A/G 位点多态性与儿童哮喘发生的相关性。方法:采用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性分析(PCR-PFLP)方法检测 186 名哮喘儿童、198 名健康儿童各个多态性位点的基因型,采用 SPSS 13.0 进行统计学分析。结果:IL-17 基因 -152A/G 位点的基因型及等位基因频率分布在哮喘组与正常对照组均存在显著性差异($p < 0.05$),哮喘组 -152A/G 位点等位基因 A 频率显著高于正常对照组($\chi^2=6.077$, $p=0.014$, $OR=1.430$, $95\%CI=1.076-1.902$)。结论:IL-17 基因 -152A/G 位点可能与儿童哮喘的发病存在关系,其中 A 等位基因可能是易感基因,携带 A 的个体可能更易患有哮喘。

关键词: 儿童哮喘; IL-10; IL-17; 多态性

中图分类号: R562.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)02-307-03

Association between Polymorphisms in Promoter Region of Interleukin-10 and Interleukin-17 Gene and Childhood Asthma

WEI Bo, ZHU Li-li, DENG Ding-fang

(Department of pediatrics 206 Institute of China Ordnance staff hospital, Shanxi Xian, 710100)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the -627A/C of interleukin-10 and -152A/G of interleukin-17 gene polymorphisms and Childhood asthma. **Methods:** Genomic DNA was isolated from the venous blood leukocytes of 186 unrelated patients with Childhood asthma and 198 healthy unrelated individuals (control group). Polymorphisms -627A/C and -152A/G were genotyped by PCR-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). Genotype and allele frequencies were analyzed by SPSS13.0 software. **Results:** There were significant differences for both allele and genotype frequencies of -152A/G of IL-17 gene between the Childhood asthma and control group. The allele A of -152A/G in Childhood asthma group was significantly higher than that in control group ($p < 0.05$). **Conclusion:** There is association between -152A/G of IL-17 gene and Childhood asthma. The individuals with A allele of -152A/G are susceptible to Childhood asthma.

Key words: Childhood asthma; interleukin-10; interleukin-17; polymorphism

Chinese Library Classification: R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-307-03

前言

支气管哮喘(简称哮喘)是多种炎症细胞参与的一种气道慢性炎症,其特征是间歇性、可逆性的气道阻塞,吸入非特异性刺激物时气道反应性增高,以血清中总 IgE 或特异性 IgE 升高为特点。哮喘是儿童呼吸系统常见病、多发病。随着分子生物学与遗传学的发展,哮喘已被证实是一种具有明显家族聚集倾向的多基因遗传病。我国儿童哮喘的患病率约为 0.5%-3.4%^[1]。目前认为哮喘的本质是气道非特异性炎症,细胞因子在哮喘气道炎症形成过程中有重要的效应和(或)免疫调节作用。IL-10 和 IL-17 作为一种免疫抑制因子,具有很强的抗炎作用,在哮喘的发生、发展过程中有重要作用。

IL-10 具有很强的炎症抑制作用,在哮喘中可减少 IL-10 诱导的 ϵ 转录,使得 IgE 的合成减少^[2],有实验发现,IL-10 在哮喘患者体内的分泌是减少或者升高的^[3]。IL-17 由 T 细胞,主

要是 CD4⁺T 细胞产生,其靶细胞广泛。IL-17 或 IL-17R 基因敲除小鼠影响免疫致敏及进一步的哮喘临床表型^[2-3]。临床研究发现,在哮喘患者诱导痰中检测到 IL-17 表达增加^[4]。近年来对于 IL-10 基因启动子区 -627A/C 多态性位点与哮喘的易感性研究结果国内外并不一致。而对 IL-17 启动子区 -152A/G (rs2275913)的研究目前并不多。

为了进一步明确 IL-10 和 IL-17 基因与中国汉族儿童哮喘的相关性,本研究通过采用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术检测 IL-10 基因启动子 -627A/C, IL-17 基因启动子区 -152A/G 这两个多态性位点的基因型,以探讨这些位点多态性分布与儿童哮喘发病的关联性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2000 年至 2009 年在中国兵器 206 研究所职工医院儿科住院及门诊患儿,哮喘组 186 例,男 96 例,女 90 例;年龄 3-14 岁;符合儿童哮喘诊断标准^[5]。正常对照组:198 例,男 100 例,

作者简介:魏波(1964-),女,主治医师,研究方向:主要从事儿科哮喘发病机制研究。电话:13571953636;E-Mail: weiboyz@126.com
(收稿日期:2010-09-13 接受日期:2010-10-10)

女 98 例;年龄 4-14 岁,对照组年龄、性别与哮喘组均有可比性,所有对照均无个人及家族哮喘史和过敏史(包括湿疹、过敏性鼻炎、过敏性皮炎)。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 标本提取 按基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega)说明书取外周血 5mL(EDTA 抗凝),冻存于 -20℃ 备用。

1.2.2 基因型检测 PCR 扩增采用 12ul 反应体系,含 50~200ng 基因组 DNA,2× PCR 缓冲液,15mmol/L MgCL₂,5umol/L 引物,0.5U Tag 酶(北京天根)。采用 PCR-RFLP 技术检测这两个位点。IL-10 基因启动子 -627A/C 的引物参照文献^[9],IL-17 基因

-152A/G 位点的引物参照文献^[7]。所有位点的引物,产物长度,PCR 反应退火温度,酶切片段见表 1。PCR 反应条件如下:95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 30s, 一定的退火温度 30s,72℃ 延伸 40s,共 30 个循环;72℃ 延伸 5min,最后 4℃ 保存。取 20μL PCR 产物,建立总体积为 20μL 的酶切反应体系,加入相应的限制性酶 RsaI 和 XmnI (NEB, 北京),37℃ 温育过夜,4℃ 水浴 15 min 终止反应。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳分离,经凝胶成像仪系统(BIO-RAD,美国)处理后进行基因型判读,记录并保存结果。

表 1 候选多态性位点的引物,退火温度,PCR 产物长度及酶切片段

Table 1 Candidate polymorphisms, polymerase chain reaction(PCR) primers annealing temperature, PCR product sizes, restriction enzymes and digested fragment size

Variants	PCR primer sequences	Annealing temperature (℃)	PCR product (bp)	Enzyme	Digestion product (bp)
-627A/C	F: 5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3' R: 5'-GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3'	50	412	RsaI	C:412 A:236+176
-152A/G	F: 5'-CAGAAGACCTACATGTTACT-3' R: 5'-GTAGCGCTATCGTCTCTCT-3'	58.5	344	XmnI	A:213+131 G:344

1.3 统计学处理

采用 HaploView4.0 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,病例组和对照组间基因型频率和等位基因频率的计算采用直接计数法。采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,Hardy-Weinberg 平衡检验,组间基因型频率及等位基因频率的差异性比较采用 χ^2 检验, $p<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

两个位点在对照组的分布均符合 Hard-Weinberg 平衡定律,表明本次抽样具有代表性。这两个多态性位点的基因型与

等位基因频率分布见表 2-3。IL-17 基因 -152A/G 位点的基因型及等位基因频率分布在哮喘组与正常对照组均存在显著性差异($p<0.05$),哮喘组 -152A/G 位点等位基因 A 频率显著高于正常对照组 ($\chi^2=6.077$, $p=0.014^*$, $OR=1.430$, 95% $CI=1.076-1.902$);IL-10 基因 -627A/C 位点的基因型及等位基因频率在正常组与哮喘组的分布无显著性差异($p>0.05$)。这些结果表明,IL-17 基因 -152A/G 位点可能与儿童哮喘的发病存在关系,其中,A 等位基因可能是易感基因,携带 A 的个体可能更易患有哮喘。而 IL-10 基因 -627A/C 位点可能与哮喘的发病没有直接的关系。

表 2 IL-10 基因 -627A/C 位点的基因型及等位基因的频率在哮喘组及对照组的分布

Table 2 Genotype and allele frequencies of the -627A/C polymorphism of IL-10 gene in childhood asthma (n=186) and controls(n=198) in a Chinese Han population

IL-10 gene	Group	Childhood asthma	Control	
-627A/C	N	186	198	
	AA	75(40.3%)	83(41.9%)	$\chi^2=1.511$ $p=0.470$
	AC	89(47.9%)	99(50.0%)	
	CC	22(11.8%)	16(8.1%)	
	N	372	396	
	A	239(64.2%)	265(66.9%)	$\chi^2=0.607$, $p=0.436$, $OR=1.126$ 95% $CI=0.836-1.516$
	C	133(35.8%)	131(33.1%)	

3 讨论

哮喘是一种以嗜酸性粒细胞、肥大细胞反应为主的气管支气管反应性增高的慢性非特异性气道炎症性疾病。多种细胞因子、细胞表面分子、免疫活性细胞、炎症细胞和炎症介质参与了

哮喘发病机制的调节,其中细胞因子涉及到哮喘免疫和炎症的多个方面和环节,儿童哮喘 IgG 介导的变态反应是形成哮喘慢性炎症反应的主要原因之一。IL-10 和 IL-17 都是由 CD4⁺Th2 细胞分泌的多效性细胞因子的种类,在哮喘发病中起重要作用。IL-10 是一种作用强的免疫调节细胞因子,它的产生通常和

炎症性过程的消除有关^[8]。IL-10 不仅能抑制 Th1 细胞合成 TNF- γ 、IL-2, 还能抑制单核细胞、NK 细胞、Th2 细胞合成多种细胞因子, 另外 IL-10 可刺激 B 细胞增殖, 并活化 B 细胞, 使其分泌相应抗体, 抑制 IgE 分泌, 同时又对抗炎症物质如具有正向调节作用。另有研究报道 CD4⁺T 细胞可以启动 IL-10 的表达来阻止过敏原诱导的气道高反应和炎症^[9]。动物研究表明

IL-17 对免疫致敏过程不可缺少, 但对哮喘表型具有负相调节作用^[2]; IL-17 的抗炎效应也在自身免疫性葡萄膜炎动物模型中被报道^[10]。哮喘发病有关的免疫反应及调节网络复杂, IL-10 和 IL-17 在其中的作用仍有待阐明。因此, IL-10 和 IL-17 基因成为研究哮喘发病的重要候选基因之一。

表 3 IL-17 基因 -152A/G 位点的基因型及等位基因的频率在哮喘组及对照组的分布

Table 3 Genotype and allele frequencies of the -152A/G polymorphism of IL-17 gene in childhood asthma (n=186) and controls(n=198) in a Chinese Han population

IL-17	gene Group	Childhood asthma	Control	
-152A/G	N	186	198	
	AA	55(29.6%)	29(14.6%)	x²=12.936 p=0.002*
	AG	78(41.9%)	107(54.0%)	
	GG	53(28.5%)	62(31.3%)	
	N	372	396	
	A	188(50.5%)	165(41.7%)	x²=6.077, p=0.014*, OR=1.430 95%CI=1.076-1.902
	G	184(49.5%)	231(58.3%)	

* 表示有统计学差异

*meas significant

双胞胎家系研究表明, IL-10 的分泌 75% 是由遗传决定的^[11], 而且 IL-10 的产生主要是受转录水平的调控, 在哮喘病人中 IL-10 及 mRNA 表达均低于正常人。人们陆续发现在 IL-10 基因启动子区存在多个多态性位点, 包括 -1082A/G, -819T/C 和 -592A/C 等, 关于这三个位点的研究较多, 我国张嘉琳等报道 -1082A/G, -819T/C 位点的基因型影响血清总 IgE 的变化, 但是并没有发现与中国人哮喘易感性相关^[12]。Lim 和 Barnes 等^[13]的研究发现在 IL-10 的 -1117-627 启动子区有 3 个碱基对不同, 从而存在 3 个表现型 GCC, ACC 及 ATA, GCC 表现型能引导较高的 IL-10 表达, ATA 型反之, 重症哮喘患者 GCC 表现型比率显著低于正常对照组, ATA 表现型比率则高于对照组, 我们的研究认为, 哮喘患者这段基因差异导致 IL-10 在体内不同水平表达与过敏性疾病病情严重程度相关, 而与疾病易感性无关。

既往研究报道 IL-17 基因 -152A/G 多态性与高加索人类风湿关节炎^[14]及日本人溃疡性结肠炎^[15]的易感性相关; 最近对台湾地区汉族哮喘儿童 IL-17 基因多个 SNPs 研究发现 IL-17 基因启动子区 rs8193036 多态性位点是儿童哮喘的候选基因, 而 IL-17 基因 -152A/G 与该地区儿童哮喘发病无关^[16], 而最近中国大陆的研究却发现, 该位点与儿童哮喘有关^[17]。本次研究显示中国北部地区人群 IL-17 基因 -152A/G 等位基因和基因型频率与哮喘的易感性相关, 这与大陆研究结果相一致而与中国台湾地区汉族的结果不一致, 其主要原因可能是样本量并不大, 而地区差异较大。

综上所述, IL-17 基因 -152A/G 位点可能与儿童哮喘的发病存在关系。本研究发现 A 等位基因为儿童哮喘的易感基因, 携带 A 的个体可能更易患有哮喘。而 IL-10 基因 -627A/C 位点可能与哮喘的发病没有直接的关系。由于哮喘属于多基因遗传

病, 目前的候选基因的开发较少, 但是单个基因少数位点的关联分析不足以解释儿童哮喘的发病原因。所以揭示更多的候选基因与哮喘的关联研究很有必要。在后期的研究中, 本课题组将加大样本量, 对样本的临床症状进行分型, 以分析特定基因多态性是如何发挥哮喘风险或是保护效应。此外, 再通过体内和体外研究将基因多态性与 mRNA 的转录和蛋白的表达联系起来, 以揭示基因变异在表达水平产生的影响, 为阐明儿童哮喘的发病机理, 提出有效的诊断和治疗的新策略奠定重要的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, et al. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10 [J]. J Immunol, 1998, 160(7): 3555-3561
- [2] Schnyder CS, Togbe D, Couillin I, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma[J]. J Exp Med, 2006, 203(12): 2715-2725
- [3] Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses [J]. Immunity, 2002, 17(3): 375-387
- [4] Sun YC, Zhou QT, Yao WZ. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(11): 953-956
- [5] 中华医学会儿科分会呼吸学组, 中华医学会《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘防治常规(试行)[J]. 中华儿科杂志 2004, 42(2): 100-106
The Subspecialty Group of Respiratory Diseases TSoP, Chinese Medical Association. The Editorial Board CJoP. The routine for prevention and treatment of bronchial asthma in children (for trial) [J]. Chin J Pediatr, 2004, 42(2): 100-106 (In Chinese) (下转第 313 页)

- lial cells[J]. Cancer Res, 2004, 64 (16) : 5702 - 5711
- [4] Watanabe O, Kinoshita J, Shimizu T, et al. Expression of a CD44 variant and VEGF- C and the implications for lymphatic metastasis and long- term prognosis of human breast cancer [J]. JExp Clin Cancer Res, 2005, 24(1): 75- 82
- [5] 何洁华, 梁小曼, 侯景辉, 等. 乳腺导管内乳头状瘤及其癌变组织 CD44v6 蛋白表达的研究[J]. 癌症, 2002, 21 (6): 615 - 618
He Jie-hua, Liang Xiao-man, Hou Jing-hui, et al. Study of CD44v6 protein expression in intraductal pappolloma and its maligant transformation of breast[J]. Chinese Journal of Cancer, 2002, 21 (6): 615-618(In chinese)
- [6] Auvinen P, Tammi R, Tammi M, et al. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan [J]. Histopathology, 2005, 47(4): 20- 28
- [7] Bruno R, Washington CB, Lu JF, et al. Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2 + metastatic breast cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 56(36): 1- 9
- [8] G.N. Hortobagyi. Trastuzumab in the treatment of breast cancer[J]. N. Engl. J. Med, 2005, 353 : 1734-1736
- [9] A.M. Gonzalez-Angulo, G.N. Hortobágyi, F.J. Esteva. Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2 /neu-positive breast cancer [J]. Oncologist, 2006, 11: 857-867
- [10] X. Li, M.T. Lewis, J. Huang, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy, J. Natl. Cancer Inst, 2008, 100 : 672-679
- [11] Liu Y J, Yan P S, Li J, et al. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(42): 6601- 6606
- [12] Bendardaf R, Elzagheid A, Lamlum H, et al. E-cadherin, CD44s and CD44v6 correlate with tumour differentiation in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2005, 13(5) : 831- 835
- [13] P. Nagy, E. Friedländer, M. Tanner, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line [J]. Cancer Res, 2005, 65: 473-482.
-
- (上接第 309 页)
- [6] Hang LW, Hsia TC, Chen WC, et al. Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-I beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma[J]. J Clin Lab Anal, 2003, 17(5): 168-173
- [7] Chen J, Deng Y, Zhao J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis [J]. J Clin Immunol, 2010, 30(4): 539-545
- [8] Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 271-283
- [9] Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, et al. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(3): 460-468
- [10] Ke Y, Liu K, Huang GQ, Cui Y, Kaplan HJ, Shao H et al. Anti-inflammatory role of IL-17 in experimental autoimmune uveitis [J]. J Immunol, 2009, 182(5): 3183-3190
- [11] Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(16): 9465-9470
- [12] 张嘉琳, 陈虹, 胡良平, 等. 白细胞介素 4 和 10 基因多态性与儿童哮喘的相关性及对细胞因子表达的影响 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82(2): 114-118
Zhang Jia-lin, Chen Hong, Hu Liangping, et al. Correlation between polymorphism of IL-4 and I L-10 gene promoter and childhood asthma and their impact upon cytokine expression [J]. Natl Med J China, 2002, 82(2): 114-118(in Chinese)
- [13] Lim S, Crawley E, Woo P, et al. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma[J]. Lancet, 1998, 352(9122): 113
- [14] Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48 (4): 367-370
- [15] Arisawa T, Tahara T, Shibata T, et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis[J]. J Clin Immunol, 2008, 28(1): 44-49
- [16] Wang JY, Shyr SD, Wang WH, et al. The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population[J]. Allergy, 2009, 64(7): 1056-1060
- [17] Chen J, Deng Y, Zhao J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis [J]. J Clin Immunol, 2010, 30(4): 539-545