贵阳地区224例哮喘儿童IL-17A-152G/A位点基因多态性及与哮喘易感性的研究*

曾 艳[1]，李 波[2]，杨 俊[2]，夏梦青[2]，朱晓萍[1]**
（1. 贵州医科大学 儿科学教研室，贵州 贵阳 550004；2. 贵州医科大学附院 儿科，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨白细胞介素-17A（IL-17A）-152G/A位点单核苷酸多态性（SNP）在贵阳地区支气管哮喘儿童的分布特征。**方法**：选择224例支气管哮喘患儿作为哮喘组，对照组为同期150例健康体检儿童，采用聚合酶链式反应－限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）方法检测两组IL-17A-152G/A位点单核苷酸多态性，分析两组基因型、等位基因频率及其与哮喘易感性的关系，采用χ^2检验分析基因型及等位基因频率。**结果**：IL-17A基因-152G/A位点AA、AG、GG 3种基因型频率在哮喘组中分别为21.4%、53.6%、25.0%，对照组中分别为11.3%、54.7%、34.0%，该位点在哮喘组与对照组间基因型频率及等位基因频率分布差异均有统计学意义（$\chi^2=7.832$，$P<0.05$；$\chi^2=6.635$，$P<0.05$），等位基因A与哮喘相关。**结论**：IL-17A基因-152G/A位点多态性可能是贵阳地区儿童支气管哮喘的候选基因，AA纯合子基因型可能与儿童支气管哮喘发病相关。

［关键词］白细胞介素-17；单核苷酸多态性；儿童；贵阳；支气管哮喘
［中图分类号］R725.6 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2015）06-0588-04

Correlation Study of the Polyporphism of Interleukin-17A -152G/A of Childhood Asthma in Guiyang

ZENG Yan[1], LI bo[2], YANG jun[2], XIA Mengqing[2], ZHU Xiaoping[1]
(*1. Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To investigate the distribution pattern of single nucleotide polymorphisms (SNP) of IL-17A-152G/A of childhood asthma in Guiyang. **Methods**: A total of 224 asthma child patients as asthma group, and the control group was comprised by 150 healthy children. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect IL-17A-152G/A polymorphism of both groups. Genotype, allele frequencies and its relation with the susceptibility to asthma of both groups were analyzed by χ^2. **Results**: The three genotype frequency, AA, AG, GG, of IL-17A gene-152G/A locus were 21.4%, 53.6%, 25.0% in asthma group and 11.3%, 54.7%, 34.0% in control group. Significant differences were found in genotype frequency and allele frequency distribution between the two groups ($\chi^2=7.83$, $P<0.05$; $\chi^2=6.635$, $P<0.05$). A allele was correlated with asthma. **Conclusion**: The-152G/A locus in IL-17A gene may be one of the important candidate gene for asthma, homozygous AA genotype may be associated with childhood asthma.
［**Key words**］ interleukin-17; single-nucleotide polymorphism; childhood; Guiyang; bronchial asthma

*［基金项目］贵州省科技厅社会发展基金项目［黔科合SY（2010）3018号］；贵阳市科技局社会发展领域科技攻关项目（2010筑科农合同字第1－社－23号）
**通信作者 E-mail：zxp_1963819@163.com
网络出版时间：2015－06－10 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150610.1733.025.html

支气管哮喘(简称哮喘)在儿童中的患病率呈逐年上升趋势[1],该病是一种慢性气道炎症性疾病,由多种细胞及细胞因子参与,以气道炎症和气道重塑为主要病理特征,慢性炎症与气道高反应性相关,气道高反应性可导致反复喘息发作、呼吸困难、胸闷和咳嗽(尤其是在夜间和凌晨)。白细胞介素-17(IL-17)是一种前炎性细胞因子,是 T 淋巴细胞诱导的炎性反应的早期启动因素,能诱导和激活中性粒细胞在呼吸道的募集,为明确 IL-17 基因与贵阳地区儿童哮喘的相关性,本研究采用病例对照的方法、PCR-RFLP 技术检测技术,探讨 IL-17A 基因-152G/A 位点的多态性及其与贵阳地区儿童哮喘发病的相关性。

1　材料与方法

1.1　研究对象与分组

哮喘组为 2012 年 11 月～2015 年 1 月确诊支气管哮喘的患儿 224 例,符合儿童支气管哮喘诊断与防治指南诊断标准[2],男 152 例,女 72 例,平均(6.11±3.27)岁。对照组为同期门诊健康体检儿童 150 例,男 93 例,女 57 例,平均(5.61±3.55)岁,对照组儿童均排除哮喘病史、家族哮喘、过敏性疾病史和其他过敏性疾病史。两组儿童均在贵阳居住半年以上,采血前 4 周内未静脉使用糖皮质激素,且均无血缘关系。

1.2　主要仪器及试剂

Eppendorf 聚合酶链反应(PCR)仪(德国艾本德公司),BeckmanDU640 型核酸蛋白分析仪(Beckman 公司),G:BOX 凝胶成像系统(基因有限公司),DNA 提取试剂盒和 2×Taq PCR MasterMix[天根生化科技(北京)有限公司],引物合成(北京鼎国生物技术有限责任公司),PdmⅠ内切酶(赛默飞世尔科技),500 bp DNAMarker[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3　方法

1.3.1　全血 DNA 提取　取空腹静脉血 3 mL,4 ℃静置 2 h,血凝块用 DNA 提取试剂盒(离心柱型,DP335)提取全血 DNA。

1.3.2　引物设计　参照 GeneBank 中人 IL-17A DNA 序列编号(NC_000006.12),根据 rs2275913 在美国国立生物技术信息中心网站上查询-152G/A 位点的基因序列,参考文献[3－4]确定突变位点,用 Primer Premier5.0 软件设计引物。

1.3.3　IL-17A 基因-152G/A 位点 PCR-RFLP 检测　上游引物序列为 5′-CAG AAG ACC TAC ATG TTA CT-3′,下游引物序列为 5′-GTA GCG CTA TCG TCT CTC T-3′。PCR 目的片段扩增 PCR 反应体系:25 μL 反应体系含 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 0.8 μL,50 mg/L DNA 模板 2 μL,ddH_2O 8.9 μL。PCR 反应条件 94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,59 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 次循环,72 ℃最后一次延伸 5 min,反应产物用 2% 琼脂糖凝胶水平电泳判断是否扩增成功。扩增产物的限制性片段长度多态性分析:15 μL酶切体系含 PCR 产物 5 μL, 10×FastDigest Green Buffer 1 μL,限制性内切酶 PdmⅠ(FastDigest PdmⅠ)0.5 μL, ddH_2O 8.5 μL,置于 37 ℃恒温水浴箱反应 5 min,转至65 ℃恒温水浴箱 5 min 使酶失活,酶切结果用 2% 琼脂糖凝胶水平电泳后采用 G:BOX 凝胶成像系统鉴定。

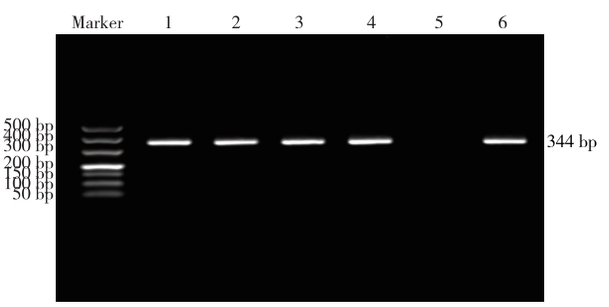
1.4　统计学方法

所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,样本分布经 Hardy-Weinberg 平衡检验,检验样本群体代表性;计数资料用百分比表示,病例组和对照组的基因型及等位基因频率分布的差异用 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　IL-17A 基因-152G/A 位点

PCR 扩增产物结果显示哮喘组和对照组均扩增出 344 bp 目的片段,见图 1。哮喘组和对照组 PCR 扩增产物经 PdmⅠ酶切后均发现 AA、AG、GG3 种基因型,AA 基因型为 213 bp、131 bp,AG 基

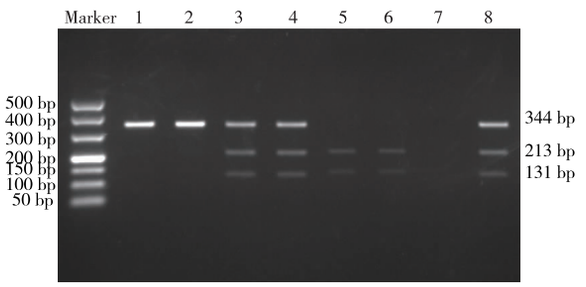


注:Marker 为 500 bp,1、2 泳道为哮喘组,3、4 泳道为对照组,5 泳道为阴性对照,6 泳道为阳性对照

图 1　哮喘组和对照组 IL-17A-152G/A 位点 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1　Electrophoresis of PCR products of the-152G/A site of IL-17A gene

因型为344 bp、213 bp、131 bp，GG基因型为344 bp。见图2。



注：Marker为500 bp，1、2泳道为GG基因型，3、4泳道为AG基因型，5、6泳道为AA基因型，7泳道为阴性对照，8泳道为阳性对照

图2 IL-17A基因-152G/A位点不同基因型PCR产物酶切电泳结果

Fig. 2 Enzyme digestion electrophoresis of PCR products of different genotypes of IL-17A gene-152G/A site

2.2 IL-17A基因-152G/A位点基因型及等位基因频率分布

哮喘组和对照组经Hardy-Weinberg平衡检测示均具有群体代表性（表1），在性别、年龄上差异均无统计学意义（$\chi^2 = 1.364$，$t = 1.388$，$P > 0.05$）。两组间基因型频率分布差异有统计学意义（$\chi^2 = 7.832$，$P = 0.020$），经χ^2分割检验，AA基因型与AG基因型频率分布差异有统计学意义（$\chi^2 = 4.395$，$P = 0.036$，$OR = 1.929$，95% $CI = 1.038 \sim 3.588$），AA基因型与GG基因型频率分布差异亦有统计学意义（$\chi^2 = 7.826$，$P = 0.005$，$OR = 2.571$，95% $CI = 1.315 \sim 5.029$），AG基因型与GG基因型频率分布差异无统计学意义（$\chi^2 = 1.426$，$P = 0.232$）；两组间等位基因频率分布差异有统计学意义（$\chi^2 = 6.635$，$P = 0.01$，$OR = 1.477$，95% $CI = 1.097 \sim 1.988$）；变异等位基因A与哮喘关联，A基因携带者患哮喘的风险高于非携带者，尤以突变纯合子AA为著。见表1。

表1 哮喘组和对照组被检儿童IL-17A基因-152G/A位点基因型及等位基因分布

Tab. 1 Characteristics of the genotype and allele frequencies of IL-17A gene-152G/A site of children in asthma group and control group

组别	n	基因型[(1)]			等位基因[(2)]		Hardy-Weinberg equilibrium(p)
		AA	AG	GG	A	G	
哮喘组	224	48(21.4%)	120(53.6%)	56(25.0%)	216(48.2%)	232(51.8%)	0.276
对照组	150	17(11.3%)	82(54.7%)	51(34.0%)	116(38.7%)	184(61.3%)	0.062

[(1)] $\chi^2 = 7.832$，$P = 0.020$；[(2)] $\chi^2 = 6.635$，$P = 0.010$

3 讨论

Th17细胞是Park于2005年在对两种自身免疫疾病动物模型，实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）、胶原诱导性关节炎（CIA）的研究过程中发现的一类不同于Th1和Th2的$CD4^+$Th亚群细胞[5]，可以诱导组织发生强烈炎症反应的T细胞亚群[6]，可以通过多种途径参与哮喘的发生发展，其效应因子IL-17与哮喘等疾病明显相关[7]。IL-17通过促进树突状细胞的成熟，刺激相关细胞产生一系列炎性介质和趋化细胞因子等，导致炎症反应的发生[8]，活化的IL-17还可激活上皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞，释放粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor，GM-CSF）、IL-1、IL-6和IL-8等，不仅促进气道炎症的进一步加剧，还能参与气道的重构。气道重塑病理基础包括气道上皮细胞和平滑肌增生，粘液高度分泌，上皮下组织纤维化，以及血管生成[9]。

研究表明，IL-17A基因的单核苷酸多态性与多种疾病相关，尤其是自身免疫性疾病[10]。一项日本研究报道，rs2275913位点（-152G/A）位于IL-17A启动子区域，可调控IL-17表达，A等位基因可增强启动子活性并增强启动子与核转录因子活化T淋巴细胞核因子的结合能力，促进IL-17表达[11]。基因内部的单核苷酸多态性直接或间接影响蛋白质表达水平或性质，从而导致遗传易感性。

Nordang等[12]对挪威和新西兰的高加索人进行研究，发现在IL-17A的5个SNP多态性基因位点中rs2275913与挪威人类风湿性关节炎的发生有关，而与新西兰的高加索人类风湿性关节炎却没有明显相关性。Arisawa等[13]对日本UC患者IL-17A/F基因多态性的分析中认为，rs2275913和

rs763780 的基因多态性均与 UC 的患病相关。

本研究结果示哮喘组及对照组均存在野生型(GG)、杂合子型(AG)及突变型(AA)三种基因型,基因型及等位基因频率在两组间差异均有统计学意义,发现 IL-17A 基因-152G/A 位点多态性与贵阳地区儿童哮喘发病存在相关性,A 等位基因频率显著高于对照组,可能增加儿童患哮喘的风险,当 G 突变为 A 时,患哮喘的风险是健康儿童的 1.477 倍,尤其以突变纯合子 AA 基因型较其他基因型更易患哮喘,为其它基因型的 2.134 倍(χ^2 = 6.376, P = 0.012, OR = 2.134, 95% CI = 1.174 ~ 3.877);Chen J 等[3]对 IL-17A rs2275913 位点基因型频率检测中发现该位点和哮喘相关,纯合子 A 的儿童患哮喘的几率是其他基因型的 2.29 倍,这与本实验结果一致。但 Wang 等[14]对台湾地区汉族哮喘儿童 IL-17A 基因多个多态性位点的研究中发现 -152A/G 位点与该地区哮喘发病无关;王娟等[15]研究发现 IL-17A 基因 rs711998 可能是儿童哮喘易感位点,其中该位点 GG 纯合子基因型与哮喘发病密切相关,未发现 IL-17A rs2275913 多态性与哮喘发病有相关性,这与本实验结果不同。哮喘是一种复杂的多基因遗传倾向的疾病,人体中基因与基因之间有着相互作用及累积效应,环境因素,在儿童中如被动吸烟、空气中的尘螨、宠物毛屑等均可影响哮喘的易感性,这些均可造成实验结果的差异。

综上所诉,IL-17A 基因-152G/A 位点可能是贵阳地区儿童哮喘的候选基因,目前指南推荐的吸入性激素(ICS)治疗虽能有效控制嗜酸性粒细胞介导的气道炎症,但对中性粒细胞炎症及气道重塑无效,IL-17 作为促进哮喘中性粒细胞炎症的重要因子,与哮喘气道重塑关系密切,有望成为防治哮喘的新靶点。进行哮喘易感基因的多态性的检测,希望能早期从基因水平筛选哮喘易感人群,以便早期诊断、干预及治疗。

4　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(10):729 - 735.

[2] 中华医学会儿科学会呼吸学组.《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. 中华儿科杂志, 2008(10):745 - 753.

[3] Chen JH, Deng Y, Zhao J, et al. The Polymorphism of IL-17 G-152A was Associatedwith Childhood Asthma and Bacterial Colonizationof the Hypopharynx in Bronchiolitis [J]. J Clin Immunol, 2010(4):539 - 545.

[4] Kaabachi W, Amor AB, Kaabachi S, et al. Interleukin - 17A and -17F genes polymorphisms in lung cancer[J]. Cytokine, 2014(1):23 - 29.

[5] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005 (11):1133 - 1141.

[6] Lan F, Liu K, Zhang J, et al. Th17 respones is augmented in OVA-induced asthmatic mice exposed to HDM [J]. Med Sci Monit, 2011(5):132 - 138.

[7] Pene J, Chevalier S, Preisser L, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes[J]. J Immunol, 2008(11):7423 - 7430.

[8] Besnard AG, Togbe D, Guillou N, et al. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation [J]. Eur J Immunol, 2011(6):1675 - 1686.

[9] Gras D, Bourdin A, Chanez P, et al. Airway remodeling in asthma: clinical and functional correlates[J]. Med Sci (Paris), 2011(11):959 - 965.

[10] zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential [J]. Clin Sci (lOND), 2012(11):487 - 511.

[11] Espinoza JL, Takami A, Nakata K, et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with actue graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation[J]. PLoS One, 2011(10):26229.

[12] 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 (4):367 - 370.

[13] Arisawa T, Tahare T, Shibata T, et al. The influenceof polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis[J]. J Clin Immunol, 2008(1):44 - 49.

[14] Wang JY, Shyur SD, Wang WH, et al. The polymorphisms of interleukin 17A(IL 17A) gene and tis association with pediatric asthma in Taiwanese population[J]. Allergy, 2009(7):1056 - 1060.

[15] 王娟,周娟,蔺丽慧,等. IL-17 基因启动子区单核苷酸多态性与儿童哮喘的关系[J]. 第二军医大学学报, 2011(5):481 - 484.

(2015-03-10 收稿,2015-04-31 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 赵　毅