

IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性及血清 IL-17A、IgE 水平 与广西黑衣壮儿童哮喘关系的研究

梁立婷^{1,2}, 林娜¹, 陆壮念², 杨丽娟², 张栋², 张淑华²

(1. 右江民族医学院附属医院儿科, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性及血清 IL-17A、IgE 水平与广西黑衣壮儿童哮喘的关系。方法 选择广西黑衣壮儿童 236 例, 其中哮喘组 121 例, 对照组 115 例。采用多重单碱基延伸 SNP 分型技术(SNaPshot)检测 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性, 用 ELISA 法检测血清 IL-17A 水平, 全自动生化分析仪测定标本血清 IgE 水平。分析两组间 rs2275913 位点基因型、等位基因分布频率及血清 IL-17A、IgE 水平差异。结果 IL-17A 基因 rs2275913 位点检测出 AA、AG、GG 三种基因型, AG 基因型(AG vs. AA: OR = 0.501, 95% CI : 0.281~0.895, P = 0.020)和 G 等位基因(G vs. A: OR = 0.645, 95% CI : 0.446~0.933, P = 0.020)在哮喘组和对照组间比较, 差异具有统计学意义。AG 基因型和 G 等位基因儿童中哮喘发病的风险可能降低。哮喘组患儿血清 IL-17A、IgE 表达水平明显高于对照组, 两组间比较差异具有统计学意义(P < 0.05)。结论 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性可能与广西黑衣壮儿童哮喘的易感性有关, 血清 IL-17A、IgE 水平升高可能与广西黑衣壮儿童哮喘发病相关。

关键词: 白细胞介素 17A; 哮喘; 单核苷酸多态性; 黑衣壮

中图分类号: R256.12

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)02-0175-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.009

Study on the relationship between the polymorphism of IL-17A gene rs2275913, serum IL-17A levels, serum IgE levels and asthma in Guangxi Black-clothes Zhuang ethnic children

Liang Liting^{1,2}, Lin Na¹, Lu Zhuangnian², Yang Lijuan², Zhang Dong², Zhang Shuhua²

(Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between the polymorphism of IL-17A gene rs2275913, the serum IL-17A levels, IgE levels and asthma in Guangxi Black-clothes Zhuang ethnic children. **Methods** A total of 236 Black-clothes Zhuang ethnic children in Guangxi including 121 children with asthma (asthma group) and 115 healthy controls (control group) were enrolled. Gene polymorphisms of rs2275913 of IL-17A gene were detected by SNaPshot technique. The serum IL-17A level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum IgE level was determined by automatic biochemical analyzer. **Results** AA, AG and GG genotypes were detected out at locus rs2275913 of IL-17A gene. The differences in the AG genotype (AG vs. AA: OR = 0.501, 95% CI : 0.281~0.895, P = 0.020) and G allele (G vs. A: OR = 0.645, 95% CI : 0.446~0.933, P = 0.020) between the asthma group and the control group were statistically significant. The risk of asthma attack may reduce in children carrying with AG genotype and G allele. Serum IL-17A and IgE levels in the asthma group were significantly higher than those in the control group, the differences were

基金项目: 国家自然科学基金(81360003)

第一作者简介: 梁立婷(1987-), 女, 在读硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 小儿呼吸与免疫疾病, E-mail: 398413299@qq.com

通讯作者简介: 林娜(1969-), 女, 医学硕士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 小儿呼吸与免疫疾病, E-mail: lin-na7766328@163.com

statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The polymorphism of rs2275913 of IL-17A gene may be a susceptibility factor for asthma in Guangxi Black-clothes Zhuang ethnic children, and the elevated serum IL-17A and IgE levels may be related to the incidence of asthma in Guangxi Black-clothes Zhuang ethnic children.

Key words: interleukin 17A; asthma; single nucleotide polymorphism; Black-clothes Zhuang

哮喘是儿童时期最常见的气道变应性疾病,以嗜酸性炎症、黏液分泌增多、气道高反应性为特征,主要由辅助性 T 细胞 2(Th2)及其细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 介导, Th1/Th2 失衡是哮喘发生的关键因素, IgE 在哮喘发生发展中也发挥重要作用。但近期研究发现^[1]包括辅助性 T 细胞 17(Th17)、固有淋巴细胞(ILCs)在内的其他炎性细胞在哮喘的发病过程中也发挥重要作用。IL-17 主要由 Th17 细胞产生,是一种重要的促炎因子,可以促进其他细胞因子如:IL-1 β 、IL-8、IL-6 等炎症因子释放,进而使炎症反应放大,同时也可以刺激机体固有免疫细胞及调节中性粒细胞表达从而发挥促炎作用。在支气管哮喘中,IL-17 通过调节固有免疫及招募中性粒细胞至气道上皮细胞,从而促进哮喘发生发展。IL-17A 是 IL-17 家族中最主要的成员, Hasegawa 等^[2]研究发现在难治性哮喘患者血清中 IL-17A 表达水平明显升高,说明 IL-17A 可能参与支气管哮喘的发病发展过程。IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与支气管哮喘的关系也有报道^[3],但结果仍存在争议,本文探讨 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性及血清 IL-17A、IgE 表达水平与广西黑衣壮哮喘儿童关系,报道如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象 选择 2018 年 5 月—2019 年 5 月在右江民族医学院附属医院就诊的广西黑衣壮哮喘患儿 121 例,其中男 58 例,女 63 例,哮喘诊断符合 2016 年儿童支气管哮喘诊断标准^[4],患儿 1 个月内未使用糖皮质激素。选择同期在右江民族医学院附属医院儿童

保健科体检 115 例血生化指标及运动发育均正常的广西黑衣壮健康儿童作为对照组,其中男 67 例,女 48 例,无过敏史,家族中无哮喘及其他免疫性疾病患者。两组受试者祖辈三代以上均为广西黑衣壮,相互之间无血缘关系。两组间年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究已获得我院医学伦理委员会批准,研究对象和/或监护人已知情并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 采集研究对象空腹外周静脉血 4 ml, 2 ml 放于 EDTA 抗凝管中,用于提取 DNA; 2 ml 存放于生化采血管,室温静置 1 h 后离心 10 min (条件:3000 r/min),将上清液转移至 2 个 EP 管中,分别用于血清 IL-17A 及 IgE 水平测定。所有标本放置-80℃冰箱保存待检。

1.2.2 IL-17A 血清水平测定 采用双抗体夹心 ELISA 法检测,严格按照人 IL-17A ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 血清 IgE 水平测定 采用全自动生化分析仪测定标本血清 IgE 水平,由我院检验科协助完成。

1.2.4 DNA 提取 严格按照离心柱型血液基因组 DNA 提取试剂盒里描述的步骤提取 DNA。

1.2.5 引物的合成 通过 primer3 在线软件(<http://primer3.ut.ee/>)设计引物,由捷瑞生物工程(上海)股份有限公司进行合成,扩增 rs2275913 位点的引物(见表 1)。

表 1 rs2275913 位点的引物序列

多态性位点	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
rs2275913	上游引物:TCTTTAGGAACATGAATTTCTGCC 下游引物:AGGGGTGACACCATTTTGG 延伸引物:CTGACTGACTGAGCCCTTCCCATTTCCTTCAGAAG	106

1.2.6 PCR 反应和基因测序 ①PCR 扩增:采用 15 μ l 反应体系,其中包括 2.0 μ l 模板 DNA, 10 \times Buffer 1.5 μ l、Mg²⁺ 1.5 μ l、1 U Taq 酶、0.3 μ l dNTP、1 μ l 多重 PCR 引物,剩余的体积用双蒸水补足至 15 μ l,充分混匀,离心,上 PCR 仪(东胜龙黑金刚 EDC-810 PCR 仪)。PCR 反应程序:95℃预变性 2 min;扩增阶段:95℃ \times 3 min,94℃ \times 15 s,55℃ \times 15 s,72℃30 s(35 cycles);最后 72℃延伸 3 min。②PCR 产物纯化:PCR 扩增后取 3 μ l 产物用 0.2 μ l ExoI(Fermentas

公司)和 0.8 μ l FastAP(Fermentas 公司)纯化。③延伸反应体系:PCR 产物 2 μ l;Snapshot Multiplex kit 1 μ l;延伸引物 1 μ l;双蒸水补足至 6 μ l。延伸反应程序:96℃ \times 1 min;96℃ \times 10 s,52℃ \times 5 s(30 cycles);60℃ \times 30 s。④测序:延伸产物取 1 μ l 加入 10 μ l buffer,95℃变性 3 min,立即冰水浴,上测序仪(ABI3730xl)。1.2.7 基因分型 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型采用 GeneMapper 4.1 软件进行分析(上海捷瑞生物工程股份有限公司协助完成)。

1.3 统计方法 用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析,Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验群体代表性。计数资料用频率和构成比表示,采用非条件 logistic 回归方程计算比值比 (OR)、95% 可信区间 (CI),评估位点基因多态性与哮喘的关联程度;计量资料服从正态分布,用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,若方差齐,组间比较采用 t 检验;若方差不齐,则采用非参数检验;相关性采用 Spearman 相关分析法,检验水准: $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-17A 基因 rs2275913 位点基因分型 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验分析, $P > 0.05$,表明所选的样本符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有群体代表性。rs2275913 位点存在 AA、AG、GG 三种基因型,基因型峰型见图 1。

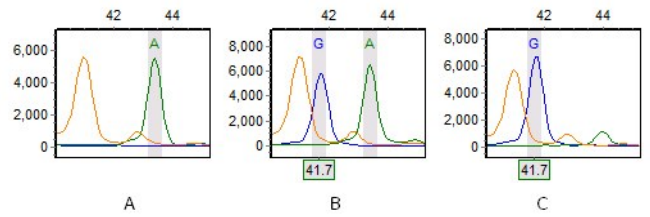


图 1 rs2275913 位点基因峰型图

注:A 为 AA 基因型峰型;B 为 AG 基因型峰型;C 为 GG 基因型峰型

2.2 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与哮喘易感性关联分析 采用 Logistic 回归分析比较 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性在对照组和哮喘组间差异,结果发现 IL-17A 基因 rs2275913 位点基因型和等位基因在哮喘组和健康组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);纳入年龄和性别调整后差异仍具有统计学意义。见表 2。

表 2 rs2275913 基因型及等位基因频率在哮喘组和健康组间比较

rs2275913	哮喘组	健康组	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)*	P*
AA	53(43.80)	32(27.83)	1.0(reference)		1.0(reference)	
AG	49(40.50)	59(51.30)	0.501(0.281~0.895)	0.020	0.516(0.286-0.930)	0.028
GG	19(15.70)	24(20.87)	0.478(0.227~1.007)	0.052	0.480(0.227-1.015)	0.055
A	155(64.05)	123(53.48)	1.0(reference)		1.0(reference)	
G	87(35.95)	107(46.52)	0.645(0.446~0.933)	0.020	0.650(0.448-0.942)	0.023

注:①* 为纳入年龄和性别为调整因素;②表内计数资料数据用 [n(%)] 表示

2.3 两组间血清 IL-17A、IgE 水平比较 哮喘组血清 IL-17A、IgE 表达水平均明显高于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$),见表 3。

表 3 血清 IL-17A、IgE 水平在哮喘组和健康组间比较

组别	n	IL-17A/(pg · ml ⁻¹)	IgE/(IU · ml ⁻¹)
健康组	115	33.23 ± 10.50	41.08 ± 17.30
哮喘组	121	45.93 ± 11.80	359.16 ± 96.67
t / Z		-8.714	-13.272
P		<0.001	<0.001

注:表内计量资料数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示

2.4 血清 IL-17A、IgE 水平与广西黑衣壮哮喘儿童的相关性分析 经 Spearman 相关性分析结果显示 IL-17A、IgE 与广西黑衣壮儿童哮喘呈正相关, r 值与 P 分别为: $r = 0.496$, $P < 0.001$; $r = 0.866$, $P < 0.001$ 。

3 讨论

支气管哮喘是一种慢性异质性疾病,各年龄阶段均可发病,患病率呈逐年增长趋势^[5],据统计全球有 3 亿多哮喘患者^[6]。哮喘受环境、遗传等多方面影响,发病机制复杂,至今尚不完全清楚。人类基因组扫描发

现染色体 6P 基因组区域与哮喘密切相关,IL-17A 基因位于 6p12.1 上,该染色体区域也曾多次报道与哮喘相关^[3,7],因此 IL-17A 也被认为是哮喘遗传易感性候选基因之一。本研究发现 IL-17A 基因 rs2275913 位点与广西黑衣壮儿童哮喘密切相关,AG 基因型和 G 等位基因可能具有降低哮喘发病的风险;血清 IL-17A、IgE 表达水平在哮喘组和对照组间比较差异具有统计学意义,且血清 IL-17A、IgE 表达水平与哮喘呈正相关。

rs2275913 位点位于 IL-17A 基因启动子位置,碱基的改变可以影响正常的转录和翻译过程,可能使体内 IL-17A 表达水平发生变化,进而引起个体对疾病的易感性差异。研究发现 IL-17A 基因 rs2275913 多态性可能与强直性脊柱炎^[8]、系统性红斑狼疮^[9]、胃癌^[10] 等相关。郭建等^[10] 通过 Meta 分析发现 rs2275913 位点多态性与胃癌发生相关,且携带 A 等位基因者患胃癌的风险更高,与殷珍珠等^[7] 人的研究结果一致。与此同时,IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性与支气管哮喘的关系也有报道,但结果并不全相同,如:孙先琳等^[11] 研究发现 rs2275913 位点多态性与儿童支气管哮喘发病密切相关,携带 AA 基因型者发生哮喘的风险明显高于携带 GG 基因型者,且 AA 基

因型可能与哮喘的严重程度及肺功能异常相关。此外,李欣艳等^[3]研究也发现 IL-17A-152G/A(rs2275913)多态性可能与贵州地区儿童哮喘发病相关且 AA 基因型可能增加哮喘发病风险。然而,Wang等^[12]研究发现 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性可能与台湾地区汉族儿童哮喘发病无关。本研究发现 IL-17A 基因 rs2275913 位点检测出 AA、AG、GG 三种基因型,两组间基因型和等位基因分布比较差异均具有统计学意义,logistic 回归分析纳入年龄和性别调整后,差异仍具有统计学意义,表明 IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性可能与广西黑衣壮儿童哮喘的遗传易感性相关,G 等位基因可能是广西黑衣壮儿童哮喘发生的保护因素,与李欣艳等^[3]、孙先琳等^[11]研究结果一致。但本次研究样本量较小,可以扩大样本量进一步研究,并在不同民族及人种间比较,寻找哮喘相关特异性基因,为哮喘的基因治疗奠定基础。

IL-17A 是 IL-17 家族中最早发现的细胞因子,研究也较多,Honda 等^[13]表明 IL-17A 能刺激肿瘤坏死因子 β (TNF- β)诱导气道上皮细胞生成 IL-8,中性粒细胞产生趋化和活化,从而促进气道炎症反应。魏秀娟等^[1]发现支气管哮喘急性发作期患儿外周血 Th17 细胞百分比、IL-17 表达水平明显高于缓解期患儿。Hasegawa 等^[2]研究发现哮喘患者血液中 IL-17A 表达水平较对照组明显升高,且在难治性哮喘患者血液中 IL-17A 表达水平则更高,与 Dimitrova 等^[14]研究的结果一致。本研究发现,在广西黑衣壮哮喘儿童中,血清 IL-17A 表达水平较健康对照组明显升高,差异具有统计学意义,进一步采用 Spearman 相关性分析血清 IL-17A 水平与广西黑衣壮哮喘儿童关系性,结果发现 IL-17A 血清表达水平与哮喘呈正相关,说明血清中高水平的 IL-17A 可能是广西黑衣壮儿童发生哮喘的危险因素。

IgE 高表达是哮喘的特征之一,其介导 I 型变态反应,当机体再次接触过敏原时,IgE 效应细胞发生脱颗粒,释放多种炎症介质,导致哮喘的气道高反应、气道重塑等发生。徐影等^[15]研究发现外周血 IgE 水平可能是评估儿童哮喘病情严重程度的重要指标。Rath 等^[16]研究也发现与 IgE 正常或降低的哮喘组比较,高 IgE 哮喘组急性发作及使用糖皮质激素次数更多,检测肺功能 FEV₁% 数值、哮喘控制实验评分更低。本研究发现,黑衣壮哮喘儿童外周血 IgE 水平明显高于健康对照组,差异具有统计学意义,采用 Spearman 相关分析发现血清 IgE 水平与广西黑衣壮儿童哮喘密切相关。

综上所述,IL-17A 基因 rs2275913 位点多态性及血清 IL-17A、IgE 表达水平可能与广西黑衣壮儿童哮喘发病存在相关性。

参考文献:

- [1] 魏秀娟,宗艳杰,宋丽琴,等.血清 IL-17 与 IL-23 在支气管哮喘患者中的表达水平及其相关性[J].现代生物医学进展,2016,16(26):5138-5140.
- [2] Hasegawa T,Uga H,Mori A,et al. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma[J]. Eur Cytokine Netw,2017,28(1):8-18.
- [3] 李欣艳,曾艳,李波,等.贵阳地区 224 例哮喘患儿 IL-17 基因多态性及其与血清 TIgE 水平的相关性研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(9):683-690.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《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(2016年版)[J].中华儿科杂志,2016,54(3):167-181.
- [5] 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.
- [6] Carr TF,Bleecker E. Asthma heterogeneity and severity [J]. World Allergy Organ J,2016,9(1):41.
- [7] 殷珍珍,王晓燕,姜相君. IL-17 基因多态性与胃癌易感性的关系[J].中国癌症防治杂志,2017,9(1):50-54.
- [8] 李秀娟,孙川,许蓓妮,等.白细胞介素-17A 及白细胞介素-17F 基因多态性与中国汉族人群强直性脊柱炎的相关性分析[J].实用医技杂志,2019,26(1):8-11.
- [9] Pasha HF,Tantawy EA,Youssef MA. Osteopontin and interleukin-17A genes polymorphisms in Egyptian systemic lupus erythematosus patients: A relation to disease activity and severity[J]. Gene,2019,702:107-113.
- [10] 郭建,王方志. IL-17 基因 rs2275913 多态性与胃癌相关性的 Meta 分析[J].右江民族医学院学报,2018,40(2):177-181.
- [11] 孙先琳,刘华君,伏伶.白细胞介素 17A rs2275913 基因多态性与儿童哮喘的相关性分析[J].华南国防医学杂志,2019,33(11):760-763.
- [12] Wang JY,Shyur 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.
- [13] Honda K,Wada H,Nakamura M,et al. IL-17A synergistically stimulates TNF- α -induced IL-8 production in human airway epithelial cells: A potential role in amplifying airway inflammation[J]. Exp Lung Res,2016,42(4):205-216.
- [14] Dimitrova D,Youroukova V,Ivanova-Todorova E,et al. Serum levels of IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 and IL-17A in pre-defined groups of adult patients with moderate and severe bronchial asthma[J]. Respir Med,2019,154:144-154.
- [15] 徐影,王健,甘丽杏.外周血内 T 淋巴细胞亚群、IgE、CRP 及 PCT 对儿童哮喘的临床意义[J].热带医学杂志,2018,18(4):515-518.
- [16] Rath N,Raje N,Rosenwasser L. Immunoglobulin E as a Biomarker in Asthma[J]. Immunol Allergy Clin North Am,2018,38(4):587-597.

收稿日期:2019-12-06;修回日期:2020-03-24