

本文引文格式:杨丽娟,邓高,陆壮念,等.广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs511898、rs44707 位点多态性研究[J].右江民族医学院学报,2021,43(4):445-449.

【论著与临床报道】

广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs511898、rs44707 位点多态性研究

杨丽娟^{1,2}, 邓高³, 陆壮念^{1,2}, 李沛隆¹, 梁立婷², 罗秀状², 林娜²

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院儿科, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院附属医院肾内科, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs511898 位点和 rs44707 位点的单核苷酸多态性(SNP)分布特点及其与不同种族/地区人群的比较。方法 采取多重单碱基延伸法(SNAPSHOT)对 94 例广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs511898、rs44707 位点进行基因分型,分析不同性别各基因型及等位基因频率分布特点并与不同地区种族进行比较。结果 rs511898 位点存在 CC、CT、TT 三种基因型,以 CC 基因型最常见,C 等位基因的频率最高;rs44707 位点存在 GG、GT、TT 三种基因型,以 GT 基因型最常见,G 等位基因的频率最高。广西壮族男女儿童 rs511898 位点、rs44707 位点基因型及等位基因的分布频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。广西壮族儿童 rs511898 位点的基因型与中国南方汉族人及美国哥伦比亚人相比差异无统计学意义($P > 0.05$),与非洲尼日利亚人、东亚日本人、南亚巴基斯坦人相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),rs511898 位点等位基因分布频率与中国南方汉族人差异无统计学意义,与非洲尼日利亚人、东亚日本人、南亚巴基斯坦人及美国哥伦比亚人相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。广西壮族儿童 rs44707 位点的基因型及等位基因分布频率与中国南方汉族人相比差异无统计学意义($P > 0.05$),与非洲尼日利亚人、日本人、南亚巴基斯坦人、美国哥伦比亚人相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 ADAM33 基因 rs511898、rs44707 位点多态性在不同种族和地区间存在差异。

关键词: 广西;壮族儿童;ADAM33;SNP;种族

中图分类号:R725 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)04-0445-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.04.001

Study on rs511898 and rs44707 polymorphisms of ADAM33 gene in children of Zhuang ethnic group in Guangxi

Yang Lijuan^{1,2}, Deng Gao³, Lu Zhuangnian^{1,2}, Li Peilong¹, Liang Liting², Luo Xiuzhuang², Lin Na²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 3. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution characteristics of single nucleotide polymorphisms (SNP) at rs511898 and rs44707 loci of ADAM33 gene in children of Zhuang ethnic group in Guangxi and to compare them with different ethnic/regional populations. **Methods** A total of 94 children of Zhuang ethnic group in Guangxi were genotyped at rs511898 and rs44707 loci of ADAM33 gene by multiple single base exten-

基金项目:广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(桂教科研[2021]1号);广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研项目(220180212)

第一作者简介:杨丽娟(1984-),女,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:小儿呼吸系统疾病,E-mail:280851506@qq.com

通讯作者简介:林娜(1969-),女,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:小儿呼吸、免疫性疾病,E-mail:linna7766328@163.com

sion (SNaPshot). We analyzed the frequency distribution of genotypes and alleles in different genders as well as compared them with those in different ethnic/regional groups. **Results** There were three genotypes, namely CC, CT and TT at the locus of rs511898, with CC as the most common genotype. And C allele had the highest frequency. There were also three genotypes at rs44707 locus, namely GG, GT, and TT, with GT as the most common gennotype. And G allele had the highest frequency. There was no significant difference in the genotype and allele frequencies at rs511898 and rs44707 loci between male and female children of Zhuang ethnic group in Guangxi ($P > 0.05$). But their genotypes at rs511898 loci were not significantly different from those of Han people in south China and those of American Columbians ($P > 0.05$), but significantly different from those of African Nigerians, East Asian Japanese, and South Asian Pakistanis ($P < 0.05$). Their distribution frequency of alleles at rs511898 locus were not significantly different from that of Han people in south China, but significantly different from that of African Nigerians, East Asian Japanese, South Asian Pakistanis and American Columbians ($P < 0.05$). Guangxi Zhuang children's genotypes and allele distribution frequency at rs44707 locus were not significantly different from those of Han people in south China ($P > 0.05$), but significantly different from those of African Nigerians, Japanese, South Asian Pakistanis and American Columbians ($P < 0.01$). **Conclusion** The polymorphisms of rs511898 and rs44707 of DAM33 gene were distinct among different races and regions.

Key words: Guangxi; children of Zhuang ethnic group; ADAM33; SNP; race

解整合素-金属蛋白酶 33(a disintegrin and metalloprotease 33, ADAM33)为锌依赖性金属蛋白酶 ADAM 家族的成员之一,属于 1 型跨膜酶原糖蛋白,位于染色体 20p13.10 的短臂上,长约 14 kb,由 21 个内含子和 22 个外显子组成。其主要生物学功能包括细胞活化、蛋白水解、分子修饰和释放、信号传导等^[1]。ADAM33 主要在平滑肌细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞等间充质细胞表达,并在这些细胞中发挥作用,而在炎症细胞、上皮细胞中的表达较少。研究表明,ADAM33 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病、过敏性鼻炎等特异性疾病有关^[2-4],其在气道重塑及哮喘精准治疗中起着重要的作用^[5-6]。本文主要研究 ADAM33 基因 rs511898、rs44707 这两个位点在广西壮族儿童中的分布特点并与其他地区民族或种族进行比较,为探讨 ADAM33 基因 SNP 的生物学功能及其与某些疾病的相关性提供更多依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2021 年 1 月—2021 年 5 月在右江民族医学院附属医院儿童保健科体检的健康儿童 94 例,其中男 52 例,女 42 例,平均年龄(5.29±2.29)岁,研究对象直系三代均为广西壮族人,相互之间无血缘关系。以上研究对象的家属和(或)监护人均知晓本研究,并自愿签署知情同意书。此研究已通过本单位的伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用乙二胺四乙酸抗凝管收集研究对象外周静脉血 2ml,使用离心柱型血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,在-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计 由上海捷瑞生物工程有限公司通过 premier 6 在线软件设计合成引物,扩增 rs511898 位点和 rs44707 位点的引物序列,见表 1。

表 1 扩增 rs511898 位点和 rs44707 位点的引物序列

多态性位点	引物序列(5'-3')		产物大小
RS511898C/T	上游引物	AACCTGTTTCTTCAGACTTCA	98bp
	下游引物	AGTGGGAATGCTGTATCTAT	
	延伸引物	CTGACTGACTAGCCCTCCAAATCAGAAGAGAC	
RS44707G/T	上游引物	GAGAACTGGGTAAAGGCA	130bp
	下游引物	GCACAAATCACCTCTGTC	
	延伸引物	CTGACTGACTGACTGACTGACTGACCCAGCATTGGGAACCTCAAG	

1.2.3 PCR 扩增 总反应体积为 15 μ l,其中包含 2 μ l,模板 DNA 1 μ l,双蒸水 5.9 μ l。充分混匀,放入 X CPR MIX 7.5 μ l,正向引物 0.3 μ l,反向引物 0.3 μ l,PCR 扩增仪扩增。反应条件:94℃预变性 3 min,按程

序 94℃ 20 s → 58℃ 20 s → 72℃ 40 s, 重复 35 个循环, 之后 72℃ 修复延伸 5 min。

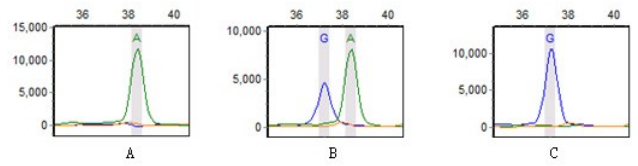
1.2.4 PCR 产物纯化 总反应体积为 7 μl, PCR 产物 3 μl, 核酸外切酶 I 0.2 μl, 碱性磷酸酶 FastAP 0.8 μl, 核酸外切酶 I buffer 缓冲液 0.7 μl, 双蒸馏水 2.3 μl, 置于 37℃ 水浴锅 15 min → 80℃ 水浴锅 15 min。

1.2.5 延伸反应 总反应体积为 6 μl, PCR 纯化产物 2 μl, SNAPSHOT mix 1 μl, 延伸引物 (10 μM) 0.2 微升/条, 双蒸馏水 2.8 μl, 按程序 94℃ 10 s → 52℃ 5 s → 60℃ 30 s 扩增 30 个循环。取 1 μl 产物, 加 9 μl 上样 HiDi, 95℃ 变性 3 min, 立即冰水浴, 上测序仪测序, 测序结果用 GeneMarker V 2.2.0 软件对 rs511898 位点和 rs44707 位点进行分型分析。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。ADAM33 基因型及其等位基因用计数法计算频率, 并进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

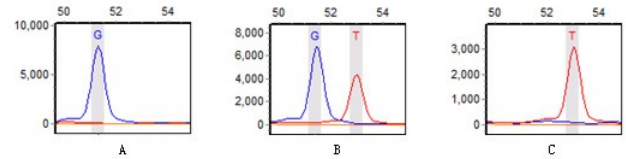
2 结果

2.1 广西壮族儿童 ADAM33 rs511898、rs44707 位点的基因分型 分型检测结果显示 rs511898 存在 3 种基因型, 分别为 CC、CT、TT, 基因型峰型, 见图 1。rs44707 存在 3 种基因型, 分别为 GG、GT、TT, 基因型峰型, 见图 2。经 Hardy-Weinberg 平衡检验分析, 两位点基因型均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 所选人群群体代表性好 ($P > 0.05$), 结果具有群体代表性。



注: rs511898 延伸引物为反向延伸, 产物为多态性的互补碱基。A 为 AA 基因型峰型; B 为 AG 基因型峰型; C 为 GG 基因型峰型。

图 1 rs511898 基因峰型图



注: A 为 GG 基因型峰型; B 为 GT 基因型峰型; C 为 TT 基因型峰型。

图 2 rs44707 基因峰型图

2.2 广西壮族儿童 ADAM33 基因多态性分布 ADAM33 基因 rs511898 位点在广西壮族儿童中以 CC 基因型最常见 (52.13%), C 等位基因的频率最高 (71.81%), 男女基因型及等位基因频率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。rs44707 位点以 GT 基因型最常见 (50.00%), G 等位基因的频率最高 (62.23%), 男女基因型及等位基因频率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs511898 位点基因型及等位基因频率分布

性别	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		CC	CT	TT			C	T		
男	52	28(53.84)	19(36.54)	5(9.62)	—	—	75(72.12)	29(27.88)	—	—
女	42	21(50.00)	18(42.86)	3(7.14)	0.505	0.818	60(71.43)	24(28.57)	0.011	0.917
合计	94	49(52.13)	37(39.36)	8(8.51)	—	—	135(71.81)	53(28.19)	—	—

注: 表内计数资料数据用 [n(%)] 表示。

表 2 广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs44707 位点基因型及等位基因频率分布

性别	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		GG	GT	TT			G	T		
男	52	22(42.31)	24(46.15)	6(11.54)	—	—	68(65.38)	36(34.62)	—	—
女	42	13(31.71)	23(54.76)	6(14.29)	1.286	0.526	49(58.33)	35(41.67)	0.983	0.321
合计	94	35(37.23)	47(50.00)	12(12.77)	—	—	117(62.23)	71(37.77)	—	—

注: 表内计数资料数据用 [n(%)] 表示。

2.3 广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs511898 位点多态性与不同地区种族的比较 rs511898 位点的基因型与中国南方汉族人及美国哥伦比亚人相比差异无统计

学意义 ($P > 0.05$), 与非洲尼日利亚人、东亚日本人、南亚巴基斯坦人相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), rs511898 位点等位基因分布频率除与中国南方

汉族人差异无统计学意义外,与非洲尼日利亚人、东亚 均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。
日本人、南亚巴基斯坦人及美国哥伦比亚人相比差异

表 3 广西壮族儿童 rs511898 基因型和等位基因分布频率与不同地区种族人群比较

组别	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		CC	CT	TT			C	T		
广西壮族儿童	94	49(52.13)	37(39.36)	8(8.51)	—	—	135(71.81)	53(28.19)	—	—
ESN	99	5(5.05)	24(24.24)	70(70.71)	87.834	<0.001	34(17.17)	164(82.83)	116.959	<0.001
CHS	105	54(51.43)	44(41.90)	7(6.67)	0.307	0.858	152(72.38)	58(27.62)	0.016	0.899
JPT	104	34(32.69)	50(48.08)	20(19.23)	9.315	0.009	118(56.73)	90(43.27)	9.730	0.002
PJL	96	33(34.37)	47(48.96)	16(16.67)	6.959	0.031	113(58.85)	79(41.14)	7.031	0.008
CLM	94	34(36.17)	49(52.13)	11(11.70)	4.859	0.088	117(62.90)	71(38.17)	3.899	0.048

注:①表内计数资料数据用[n(%)]表示;②ESN(非洲尼日利亚人)、CHS(中国南方汉人)、JPT(东亚日本人)、PJL(南亚巴基斯坦人)及 CLM(美国哥伦比亚人)的基因型及等位基因频率数据均来源于 ensemble 数据库公布的千人基因组计划。

2.4 广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs44707 位点多态性与不同地区种族的比较 广西壮族儿童 ADAM33 基因 rs44707 位点的基因型及等位基因分布频率与中国南方汉族人差异无统计学意义($P > 0.05$),与非洲尼日利亚人、东亚日本人、南亚巴基斯坦人及美国哥伦

比亚人相比差异有统计学意义($P < 0.05$),rs44707 位点等位基因分布频率除与中国南方汉族人差异无统计学意义外,与非洲尼日利亚人、东亚日本人、南亚巴基斯坦人及美国哥伦比亚人相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 4 广西壮族儿童 rs44707 基因型和等位基因分布频率与不同地区种族人群比较

组别	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		GG	GT	TT			G	T		
广西壮族儿童	94	35(37.23)	47(50.00)	12(12.77)	—	—	117(62.23)	71(37.77)	—	—
ESN	99	17(17.17)	44(44.44)	38(38.38)	19.733	<0.001	78(39.39)	120(60.61)	20.125	<0.001
CHS	105	41(39.05)	45(42.86)	19(18.10)	1.494	0.474	127(60.48)	83(39.52)	0.129	0.719
JPT	104	20(19.23)	59(56.73)	25(24.04)	9.536	0.008	99(47.60)	109(52.40)	8.534	0.003
PJL	96	11(11.46)	35(36.46)	50(52.08)	37.551	<0.001	57(29.69)	135(70.31)	40.536	<0.001
CLM	94	14(14.89)	50(53.19)	30(31.91)	16.807	<0.001	78(41.49)	110(58.51)	16.203	<0.001

注:①表内计数资料数据用[n(%)]表示;②ESN(非洲尼日利亚人)、CHS(中国南方汉人)、JPT(东亚日本人)、PJL(南亚巴基斯坦人)及 CLM(美国哥伦比亚人)的基因型及等位基因频率数据均来源于 ensemble 数据库公布的千人基因组计划。

3 讨论

ADAM33 已被证实与气道重塑有关,它是由转化生长因子- β 诱导的胞外域脱落而产生的,具有促血管生成作用^[7-8]。国内外研究表明,ADAM33 与肿瘤的发生密切相关,Manica GCM 等^[9] 研究证实了 ADAM33 蛋白的缺乏或低表达可能会增加乳腺癌细胞的侵略和转移,其发生机制尚不明确。Stasikowska-Kanicka O 等^[10] 发现了 ADAM33 在鼻窦倒置型乳头状瘤和喉鳞状细胞癌中过表达。张国华等^[11] 采用免疫组化染色和甲基化 DNA 免疫共沉淀-定量 PCR 法检测 90 例胆管癌患者肿瘤组织和癌旁正常组织中 ADAM33 蛋白表达和基因甲基化程度,结果显示 ADAM33 蛋白在胆管癌组织中表达上调,其表达不受 ADAM33 启动子甲基化调控的影响,但与肿瘤分期、

转移及预后有关。以上研究表明,ADAM33 过度表达或低表达均可增加肿瘤发生的风险,部分肿瘤的发生推测可能与 ADAM33 的促血管生成作用有关。故可将 ADAM33 作为一种新型分子标志物,用于明确某些肿瘤的分型、治疗及预后判断。Feng HH 等^[12] 通过荟萃分析探讨了 ADAM33 基因 rs511898 位点与 COPD 易感性之间的关系,结果显示 ADAM33 基因 rs511898 位点突变基因 A 可能增加亚洲人群中 COPD 的风险。王莎莎等^[13] 采用 SNaPshot SNP 分型技术对新疆地区哈萨克族 193 例对照组及 197 例 COPD 病例组检测 ADAM33 基因各位点多态性,研究发现 ADAM33 基因 rs511898 多态性与可能与新疆哈萨克族人群 COPD 的发生有关。Li HF 等^[14] 的荟萃分析亦表明亚洲人群中 rs511898 多态性的等位基因和基因型与

哮喘易感性有关。Liang SQ等^[15]在按种族进行的亚组分析的一项荟萃分析中也提及,ADAM33基因rs511898多态性仅在亚洲人中发现了阳性结果,而在欧洲或拉丁美洲则没有。由上述研究可推测ADAM33基因rs511898位点多态性可能是亚洲人群哮喘及COPD发病的危险因素。

本文通过对广西壮族儿童ADAM33基因rs511898和rs44707位点SNP分析,结果显示ADAM33基因rs511898和rs44707位点的基因型及等位基因频率在男女性别间比较均无差异,说明这2个位点基因型与等位基因分布可能与性别无关。通过与ensemble数据库公布的千人基因组计划中的数据进行比较,发现广西壮族儿童rs511898位点各基因型及等位基因的分布频率与非洲尼日利亚人、日本人、南亚巴基斯坦人相比,差异均有统计学意义,其基因型分布频率与美国哥伦比亚人相比,差异无统计学意义,而等位基因分布频率与美国哥伦比亚人相比,差异具有统计学意义;广西壮族儿童rs44707位点各基因型及等位基因的分布频率与上述4国家的人群比较均有统计学意义;两位点各基因型及等位基因的分布频率与中国南方汉人相比,差异均无统计学意义。以上结果表明,rs511898和rs44707位点SNP可能与种族和地域存在密切关系,广西壮族儿童与中国南方汉人同属一个种族,均生活在南方地带,亲缘关系较接近,故SNP差异不大,而与非洲尼日利亚人、东亚日本人、南亚巴基斯坦人亲缘关系较远,且生活的环境、地域、饮食、生活习惯均不同,故SNP差异较大,这亦符合生物多样性的遗传进化规律,而这种遗传进化可能导致某些疾病在特定人群或地域中的发病率增高。对于rs511898 C/T位点,广西壮族儿童的基因型与美国哥伦比亚人比较差异无统计学意义,其等位基因分布频率与美国哥伦比亚人相比,差异具有统计学意义,提示等位基因C可能是风险等位基因,这为后续探讨该位点与广西壮族儿童某些特定疾病的相关性提供了重要线索。

参考文献:

[1] Shen B, Lin R, Wang CC, et al. ADAM33 gene polymorphisms identified to be associated with asthma in a Chinese Li population[J]. Biomed Rep, 2017, 6(3): 323-328.

[2] 吴大威, 杨玉双, 崔清志, 等. 8-异前列腺素、ADAM33基因、超敏C反应蛋白在慢性阻塞性肺病患者血清中表达的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(14): 1782-1785.

[3] 陈惠琳, 李献清, 朱振潮, 等. 变应性鼻炎合并哮喘差异性表达基因筛选研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 32(10): 762-766.

[4] 王珊, 关键, 安瑞芬, 等. 新疆维族、汉族COPD易感性与ADAM33基因F+1、V4位点多态性的关系[J]. 山东医药, 2015, 55(45): 18-22.

[5] 张立媛, 胡昕, 姚丽丹, 等. 白介素-4对气道壁血管平滑肌细胞ADAM33基因表达的影响研究[J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(3): 265-269.

[6] 陶韬, 朱小华, 古嫦英, 等. ADAM33在IL-4刺激的人气道平滑肌细胞中对NF- κ B和TGF- β 1表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(10): 1391-1396.

[7] Yang YW, Wicks J, Haitchi HM, et al. Regulation of a disintegrin and metalloprotease-33 expression by transforming growth factor- β [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 46(5): 633-640.

[8] Puxeddu I, Pang YY, Harvey A, et al. The soluble form of a disintegrin and metalloprotease 33 promotes angiogenesis: implications for airway remodeling in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(6): 1400-1406.

[9] Manica GCM, Ribeiro CF, Oliveira MAS, et al. Down regulation of ADAM33 as a predictive biomarker of aggressive breast cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44414.

[10] Stasikowska-Kanicka O, Wagroeska-Danilewicz M, Danilewicz M. Immunohistochemical study on ADAM33 in sinonasal inverted papillomas and squamous cell carcinomas of the larynx[J]. Arch Med Sci, 2016, 12(1): 89-94.

[11] 张国华, 谭大勇, 李娜, 等. ADAM33在胆管癌中的表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(10): 895-899.

[12] Feng HH, Mao L, Pan K, et al. Association between F+1 polymorphism in a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene and chronic obstructive pulmonary disease susceptibility: An evidence-based meta-analysis[J]. Gene, 2019, 719: 144009.

[13] 王莎莎, 关键, 王珊, 等. 新疆地区哈萨克族慢性阻塞性肺疾病易感性与ADAM33基因多态性的关系[J]. 天津医药, 2015, 43(12): 1349-1352, 1353.

[14] Li HF, Yan LP, Wang K, et al. Association between ADAM33 polymorphisms and asthma risk: a systematic review and meta-analysis[J]. Respir Res, 2019, 20(1): 38.

[15] Liang SQ, Wei X, Gong C, et al. A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis [J]. Hum Immunol, 2013, 74(5): 648-657.

收稿日期: 2021-05-27; 修回日期: 2021-07-12