

TIM-3 基因启动子区-1516G/T(Rs10053538)和外显子区-882C/T(Rs4704853),-574T/G(Rs1051746)位点多态性与蒙古族儿童哮喘的关系研究*

金秀华¹, 李艳冬²

(1. 赤峰市蒙医中医医院检验科, 内蒙古赤峰 024000;

2. 赤峰市红山区妇幼保健所检验科, 内蒙古赤峰 024000)

摘要:目的 探讨哮喘免疫调节基因 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域 3 (Tim-3) 启动子区多态性位点-1516G/T (Rs10053538) 和外显子区多态性位点-882C/T (Rs4704853), -574T/G (Rs1051746) 与内蒙古地区蒙古族儿童哮喘的遗传易感性。方法 收集赤峰市蒙医中医医院和红山区妇幼保健所 2014 年 6 月~2016 年 12 月哮喘组儿童 129 例, 平均年龄 6.2 岁; 正常体检对照组儿童 130 例, 平均年龄 6.0 岁。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 检测所有研究对象的三个多态性位点的基因型, 进行病例对照研究分析。结果 哮喘组-574T/G (Rs1051746) 位点基因多态性的 T 等位基因明显高于对照组, 差异有统计学意义 (OR=0.239, 95%CI 0.067~0.858, $P<0.05$)。哮喘组 Tim-3 启动子区-1516G/T (Rs10053538) 位点基因多态性与对照组比较 OR=0.835, 95%CI 0.371~1.883, $P=0.664$; 哮喘组外显子-882C/T (Rs4704853) 位点基因多态性与对照组比较, 差异无统计学意义 (OR=0.326, 95%CI 0.33~3.172, $P=0.310$)。结论 Tim-3 基因-574T/G (Rs1051746) 位点与蒙古族儿童哮喘易感性相关, 为内蒙古地区儿童哮喘的发病机制研究提供参考。

关键词: T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域 3; 单核苷酸多态性; 儿童哮喘

中图分类号: R725.6; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)04-073-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.019

Relationship between TIM-3 Gene Promoter Region -1516G/T (Rs10053538), Exon Region -882C/T (Rs4704853), -574T/G (Rs1051746) Polymorphisms and Asthma of Mongolian Nationality Children

JIN Xiu-hua¹, LI Yan-dong² (1. Department of Clinical Laboratory,

the Mongolian Medicine Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chifeng City, Inner

Mongolia Chifeng 024000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Hongshan District

Health Center for Women and Children of Chifeng City, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

Abstract: Objective To elucidate whether the polymorphisms within the asthma immune regulator gene T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 two polymorphism loci, -882C/T (Rs4704853), -574T/G (Rs1051746) at exon region and one polymorphism loci, -1516G/T (Rs10053538) at promoter region were associated with the risk of Mongolian nationality childhood asthma. Methods Polymerase chain reaction (PCR) was used to test the genotypes of three polymorphism loci among 129 cases (average 6.2y) of asthma and 130 controls (average 6.0y) in a case-control study collected from June of 2014 to June of 2016. Results The results of PCR-RFLP showed that the three polymorphisms in TIM-3 gene were present in the study population. TIM-3 -574T/G (Rs1051746) polymorphism was associated with Mongolian nationality childhood asthma (OR=0.239, 95%CI 0.067~0.858, $P<0.05$), but at promoter region -1516G/T (Rs10053538) polymorphism (OR=0.835, 95%CI 0.371~1.883, $P=0.664$) and -882C/T (Rs4704853) at exon region (OR=0.326, 95%CI 0.33~3.172, $P=0.310$) were not. Conclusion These results indicated that -574T/G (Rs1051746) polymorphism of the TIM-3 gene was associated with Mongolian nationality childhood asthma, providing a better understanding of the pathogenesis of the allergic asthma among children in Inner Mongolia.

Keywords: T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3; single nucleotide polymorphism; childhood asthma

由于哮喘的发生与遗传和环境因素有关, 近年来发病率在全球范围内呈上升趋势, 这与全球工业

化进程加速及人们对遗传性疾病的认识不断深入密不可分^[1]。我国 16 城市儿童哮喘患病率逐年升

* 作者简介: 金秀华 (1972—), 女, 本科, 副主任检验师, 检验科主任, 主要从事哮喘基因多态性基础研究, E-mail: 1813214327@qq.com。

高,较20年前上升了147.9%,并且哮喘发病年龄也有逐年降低的趋势^[2]。自从2001年新发现的基因T细胞免疫球蛋白黏蛋白域(T cell immunoglobulin domain and mucin domain TIM)基因家族在鼠11号染色体被McIntire等^[3]人发现后,其基因家族包括:Tim-1、Tim-3和Tim-4,以往的研究发现哮喘的主要遗传易感位点就在此区域。随着近年来精准医疗的兴起及基因测序的普及和费用的降低,Tim-3基因多态性与汉族人群哮喘的研究有多篇报道,但尚未见Tim-3基因多态性与我国蒙古族人群哮喘的报道。本研究选取Tim-3基因启动子区一个多态性位点-1516G/T(Rs10053538)和外显子区两个多态性位点-882C/T(Rs4704853)、-574T/G(Rs1051746),研究其与蒙古族儿童哮喘的关系,以为蒙古族儿童哮喘的诊断和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 哮喘组为2014年6月~2016年12月在赤峰市蒙医中医医院和赤峰市红山区妇幼保健所门诊及住院的2~15岁蒙古族哮喘儿童129例(女57例,男72例),平均年龄6.2岁;对照组为同期无哮喘等变应性疾病来院健康体检的蒙古族儿童130例(女55例,男75例),平均年龄6.0岁。哮喘组儿童选择标准符合中国支气管哮喘防治指南(基层版)中支气管哮喘诊断标准^[4]。对照组选择标准如下:①无心血管疾病及其他慢性疾病;②无变应性哮喘、过敏性鼻炎、湿疹等变应性疾病。本研究获得红山区妇幼保健所及赤峰市蒙医

中医医院伦理委员会和儿童家长的知情同意。

1.2 试剂及仪器 蛋白酶K购自美国Sigma,提取DNA采用OMEGA公司的专用DNA提取试剂盒(E. Z. N. A. TMSEBlood DNA Kit),DNA聚合酶选择大连宝生物高保真TaKaRa的Blood Genome DNA Extraction Kit进行扩增,引物由上海生工合成,限制性内切酶选自Fermentas公司,溴化乙锭(EB)购自美国Promega公司,紫外分光光度计DU 640购自美国Beckman公司。

1.3 方法 所有研究对象抽取静脉血2 ml以上,EDTA抗凝管存贮,取白细胞集中的中间层采用蛋白酶K进行处理后,用DNA提取试剂盒提取DNA后,-20℃冰箱编号并分类保存。选取GenBank中Tim-3基因启动子区三个多态性位点Rs10053538,Rs4704853,Rs1051746。引物合成参照朱圣韬等^[5]的研究报道。对Tim-3基因三个多态性位点采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)进行扩增。PCR反应体系50 μl,包括50ng的DNA模板,1 mmol/L MgSO₄,0.2 μmol/L各个引物,0.2 mmol/L的dNTPs,1U的TaKaRa DNA聚合酶和10×PCR缓冲液5 μl。PCR循环情况包括最初预变性94℃3 min,94℃变性30 s,Rs10053538,Rs4704853和Rs1051746位点35 s退火温度分别是60℃,55℃,60℃和72℃延长40 s,共30个循环。72℃延长10 min。酶切后采用1.8 ml/dl的琼脂糖电泳和溴化乙锭(EB)染色后,在紫外灯下依据酶切结果分型。具体限制性内切酶及酶切产物,见表1。

表1 TIM-3基因多态性引物设计及酶切产物

多态性位点	引物序列	退火温度(℃)	产物(bp)	限制性内切酶	酶切产物(bp)
Rs10053538(-1516G/T)	F1:5'-GCCTTGACCAAGTTCATGCT-3'	60	404	Bsi I	40 433 866
	F2:5'-ACCACCCCGGATAATTTTGT-3'				
Rs4704853(-882C/T)	F1:5'-CTTTTGCTTTTAAGGTGTC-3'	55	273	BsoB I	273 132 141
	F2:5'-TTCAAACCTTCCAACCTCTC-3'				
Rs1051746(-574G/T)	F1:5'-AGAAGAAGGATGAGAGTGAGGCTTATGCTGGGAGTTTC-3'	60	169	Taq I	16 913 237
	F2:5'-ACTCAAATCAGTCCCTTCATC-3'				

1.4 统计学分析 采用Arlequin统计软件对哮喘组和对照组进行Hardy-Weinberg平衡检验($P > 0.05$,表示符合哈-温平衡)。采用Fisher χ^2 检验(SPSS17.0)分析两组间基因型和等位基因之间的差异,并计算哮喘遗传多态性的风险(OR)和95%的可信区间(CI)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 Tim-3基因在两组间基因型和等位基因

分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$),群体具有代表性。哮喘组Rs1051746位点基因多态性的基因型和等位基因频率与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),哮喘组Rs1051746位点的T等位基因频率(12%)明显高于对照组(3%),差异有统计学意义($OR = 0.239, 95\% CI 0.067 \sim 0.858, P < 0.05$),见表2。

表2 Tim-3 基因三种多态性位点在两组间基因型、等位基因分布

多态性位点	基因型/等位基因	哮喘组(n=129)	对照组(n=130)	OR95%CI	χ^2	P
Rs10053538 (-1516G/T)	G/G	115(89.1)	118(90.8)	1.000	0.189	0.664
	G/T	14(10.9)	12(9.2)	0.835(0.371~1.883)		
	G	244(94.6)	248(95.4)	1.000	0.178	0.673
	T	14(5.4)	12(4.6)	0.843(0.382~1.860)		
Rs4704853 (-882C/T)	C/C	126(97.7)	129(99.2)	1.000	1.027	0.311
	C/T	3(2.3)	1(0.8)	0.326(0.33~3.172)		
	C	255(98.8)	259(99.6)	1.000	1.021	0.312
	T	3(1.2)	1(0.4)	0.328(0.034~3.176)		
Rs1051746 (-574T/G)	G/G	117(90.7)	127(97.7)	1.000	5.784	0.016
	G/T	12(9.3)	3(2.3)	0.230(0.063~0.837)		
	G	246(95.3)	257(98.8)	1.000	5.622	0.018
	T	12(4.7)	3(1.2)	0.239(0.067~0.858)		

3 讨论 现代医学可以完全控制哮喘急性发作时的症状,但尚无法根治哮喘,其易反复发作,严重影响患儿的正常生活、学习及生长发育,最终增加家庭及整个社会的经济负担。儿童哮喘的患病率逐年呈增长的趋势已经成为公认的事情,与赤峰市在地理位置和人口结构上较为相似的包头,0~14岁儿童哮喘的患病率从1990年最初调查的0.37%已经上升到2010年调查时的0.90%,哮喘的患病率在20年间几乎上涨了3倍^[2],这说明了内蒙古地区儿童哮喘的患病率也不容忽视。此次选取Tim-3三个基因多态性位点研究与蒙古族儿童哮喘的关系,以期从遗传学的角度,对蒙古族儿童哮喘的发病提供参考。Tim-3基因在人类由301个氨基酸组成,全长约23kb,是具有基序的I型膜蛋白。在Tim-3基因的编码区和启动子区均发现有基因多态性的存在,其与机体对某些免疫性疾病的耐受性和易感性有关^[5]。Tim-3分子对Th1细胞负性调节作用,主要表达在终末期的Th1表面。本研究发现Tim-3基因Rs1051746多态性位点与蒙古族儿童哮喘有关。2004年Chae等^[7]在韩国人群中研究发现Tim-3基因外显子区-574T/G(Rs1051746)多态性位点与成人过敏性鼻炎、类风湿关节炎和哮喘相关。随后,我国学者巫学兰等^[8]人在湖北地区儿童及成人均证实Tim-3基因-574T/G多态性位点与哮喘有关。吴立强等^[9]人运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性检测Tim-3基因多态性位点,对重庆地区200例儿童咳嗽变异性哮喘患儿采用病例对照研究发现:Tim-3基因外显子区的-574T/G(Rs1051746)多态性位点与儿童咳嗽变异性哮喘易感性有关,其携带T-C-G单体型的人群罹患咳嗽变异性哮喘的风险也较高。我们的研究证实Tim-3基因外显子区-574T/G(Rs1051746)位点与蒙古族儿童哮喘有关。以上

研究均证实Tim-3基因多态性与儿童哮喘易感性有关。梁涛等^[10]对采用病例对照研究对60例哮喘急性发作者检测外周血Tim-3 mRNA水平,发现其明显高于对照组,提示Tim-3基因多态性可能影响了Tim-3的表达,最终参与了哮喘的发生、发展。

虽然本研究证实Tim-3基因外显子区-574T/G(Rs1051746)位点与蒙古族儿童哮喘有关,但尚未发现大样本、多中心的研究结果支持。期待以后能有更多的有关各民族基因遗传方面的研究,为我国这样一个多民族国家疾病防治提供参考。

参考文献:

- [1] Pedersen SE, Hurd SS, Lemanske RF, et al. Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2011, 46(1): 1-17.
- [2] 刘传合, 洪建国, 尚云晓, 等. 中国16城市儿童哮喘患病率20年对比研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2015, 30(8): 596-600.
- [3] Liu CH, Hong JG, Shang YX, et al. Comparison of asthma prevalence in children from 16 cities of China in 20 years [J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2015, 30(8): 596-600.
- [4] McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(12): 1109-1116.
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组, 中华医学会儿科分会. 中国支气管哮喘防治指南(基层版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(5): 331-336.
- [6] Asthma Unit of Respiratory Branch of Chinese Medical Association, General Medicine Branch of the Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of bronchial asthma in China (basic level version) [J]. *Chinese Journal* (下转80页)

- of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2013, 36 (5):331-336.
- [5] 朱圣韬,曹邦伟,徐昌青,等. TIM-3 基因启动子区多态性与胃癌易感的相关性研究[J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(3):299-302.
- Zhu ST, Cao BW, Xu CQ, et al. The correlation between the TIM-3 gene promoter polymorphisms and the risk of gastric cancer[J]. Journal of Capital Medical University, 2010, 31(3):299-302.
- [6] Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2008, 205(12):2763-2779.
- [7] Chae SC, Park YR, Lee YC, et al. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population[J]. Human Immunology, 2004, 65 (12):1427-1431.
- [8] 巫学兰,崔天盆,吴健民. Tim-3 启动子区-574 基因多态性与变应性哮喘的关系[J]. 微循环学杂志, 2006,

16(4):50-52.

- Wu XL, Cui TP, Wu JM. The association of Tim-3 promoter region -574 gene polymorphism and allergic asthma[J]. Chinese Journal of Microcirculation, 2006, 16(4):50-52.
- [9] 吴立强,陈建平,何念海,等. TIM-3 基因多态性与儿童咳嗽变异性哮喘的关系[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(22):2302-2305.
- Wu LQ, Chen JP, He NH, et al. Relationship between TIM-3 polymorphism and childhood cough variant asthma[J]. Journal of Third Military Medical University, 2012, 34(22):2302-2305.
- [10] 梁 涛,张 杨,许依婷,等. 哮喘患者外周血单个核细胞 TIM-3 及 Galectin-9 的表达与临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1):52-54.
- Liang T, Zhang Y, Xu YT, et al. Express of TIM-3 and galectin-9 genes in peripheral blood mononuclear cells from patients with asthma[J]. Journal Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(1):52-54.
- 收稿日期:2018-03-16
修回日期:2018-04-12