

蒙古族儿童哮喘与 TIM-1 基因启动子区-416G>C,-1454G>A 位点多态性 和外显子 4 插入/缺失变异的相关性研究*

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 探讨内蒙古地区蒙古族儿童哮喘免疫调节基因 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域 1(TIM-1) 启动子区-416G>C,-1454G>A 和外显子 4 插入/缺失变异与儿童哮喘的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测方法, 分别对蒙古族哮喘组儿童 129 例和对照组儿童 130 例检测 Tim-1 启动子区-416G>C,-1454G>A 两个多态性位点和外显子 4 插入/缺失变异, 进行病例对照研究分析。利用 SPSS17.0 对基因型/等位基因等计数资料采用 Fisher χ^2 检验分析统计学差异。结果 哮喘组-416G>C 位点基因多态性的 C 等位基因明显低于对照组, 差异有统计学意义($OR=1.682, 95\%CI 1.146\sim2.268, P<0.05$)。哮喘组 TIM-1 启动子区-1454G>A 位点基因多态性与对照组比较($\chi^2=0.561, P=0.755$)差异均无统计学意义; 哮喘组外显子 4 插入/缺失变异与对照组比较, 差异均无统计学意义($\chi^2=1.013, P=0.602$)。结论 Tim-1 基因-416G>C 位点与蒙古族儿童哮喘易感性相关。

关键词:儿童哮喘; 单核苷酸多态性; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域 1(TIM-1)

中图分类号:R725.6; Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2018)06-026-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.06.007

Relationship between TIM-1 Gene Promoter Region -416G>C,-1454G>A, Exon 4(157insMTTTP) Polymorphisms and Mongolian Nationality Childhood with Asthma

JIN Xiu-hua¹, LI Yan-dong² (Department of Clinical Laboratory, the Traditional Mongolian
Medicine of Chinese Medicine Hospital of Chifeng City, Inner Mongolia Chifeng 024000,
China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hongshan District Health Center
for Women and Children of Chifeng City, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

Abstract: Objective To explore whether the SNPs in TIM-1 exon 4 (157insMTTTP) and two polymorphism loci, -416G>C,-1454G>A at promoter region were associated with childhood asthma in population in Inner Mongolia. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to test the genotypes of three polymorphism loci among 129 cases of asthma and 130 controls in a case-control study. Using the count data of genotypes/alleles in SPSS17.0, Fisher χ^2 test was used to analyze the statistical differences. **Results** TIM-1 -416G>C polymorphism was associated with childhood asthma in population in Inner Mongolia ($OR=1.682, 95\%CI 1.146\sim2.268, P<0.05$), but at promoter region -1454G>A polymorphism ($\chi^2=0.561, P=0.755$) and exon 4 (157insMTTTP) at exon region ($\chi^2=1.013, P=0.602$) were not. **Conclusion** The results indicated that -416G>C polymorphism of the TIM-1 gene was associated with childhood asthma in population in Inner Mongolia.

Keywords: childhood asthma; single nucleotide polymorphism; T cell immunoglobulin domain and mucin domain 1(TIM-1)

支气管哮喘是一种以慢性气道炎症和高反应性为特征的异质性疾病^[1]。随着我国工业化进程的不断加速,哮喘的发病也呈逐年增加的趋势。我国 16 城市儿童哮喘的总发病率较 10 年和 20 年前分别上升了 43.4%, 147.9%^[2], 并且还有向低龄化发展的趋势, 儿童哮喘的防治任重而道远。哮喘是一种多因素疾病, 常用药物虽能控制哮喘的急性

期临床症状, 但无法彻底根治, 对患儿的生长发育及身心健康均产生不利影响。近年来随着人类基因组计划的实施, 基因研究已成为热点。哮喘作为一种遗传和环境相互作用引起的多因子多基因遗传病, 其易感基因研究自然受到多方关注, T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域(T cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM) 基因家族被 McIn-

* 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。

tire 等^[3]在小鼠身上首次报道。人类的 TIM 基因家族 (Tim-1, Tim-3 和 Tim-4) 定位于染色体 5q33.2^[4~6], 此区域是哮喘的主要遗传易感位点之一。TIM-1 基因被第一个发现, 其存在基因多态性, 之前的研究发现其基因多态性与儿童哮喘有关, 但未发现与我国蒙古族儿童哮喘的报道, 本次我们研究 TIM-1 启动子区两个多态性位点 -416G>C, -1454G>A 和外显子 4 插入/缺失变异三个位点与蒙古族儿童哮喘的关系, 以期对蒙古族儿童哮喘的防治提供参考。

1 材料方法

1.1 研究对象 所有研究对象种族均是蒙古族, 年龄 2~14 岁, 哮喘组来自内蒙古赤峰市蒙医中医医院和红山区妇幼保健所, 2015 年 6 月~2016 年 12 月儿科门诊及住院部就诊患儿共 129 例, 其中男孩 72 例, 女孩 57 例, 平均年龄 6.2 岁; 对照组为同期来院健康体检儿童共 130 例, 其中男孩 75 例, 女孩 55 例, 平均年龄 6.0 岁。儿童支气管哮喘诊断标准符合儿童支气管哮喘诊断与防治指南^[7]。哮喘组纳入标准: ①符合儿童支气管哮喘诊断; ②使用支气管扩张剂等平喘药物可以缓解或者改善患儿喘息症状; ③之前有三次以上临床出现胸闷、气短、喘息病史或者查体肺部可闻及典型的呼气相哮鸣音。排除标准: ①有其他慢性病史; ②有严重的心肾脑等重要脏器损害。对照组选择标准如下: ①无哮喘等变应性疾病病史; ②排除其他心脑血管疾病及其他慢性病。本研究获得儿童家长的知情同意及赤峰市蒙医中医医院和红山区妇幼保健所伦理委员会的批准。

1.2 试剂与仪器 美国 Sigma 提供蛋白酶 K, 大

连宝生物 (TaKaRa) 提供高保真 DNA 聚合酶 (blood genome DNA extraction kit), 上海生工合成引物, 美国 Fermentas 公司提供限制性内切酶, 美国 Promega 公司提供 EB(溴化乙锭), 美国 Bio-Rad 公司提供凝胶成像分析仪 (Gel-2000 型)。

1.3 方法 采用 EDTA 抗凝管抽取静脉血 2 ml, 取血清层下红细胞层上的部分, 采用蛋白酶 K 进行处理后, 采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后 -20℃ 保存。以数据库 GenBank 中人类 5 号染色体序列 (NT_023133.12) 为参考序列, 自行设计外显子 4 插入/缺失 (157insMTTTPV) 引物。启动子区 -416G>C, -1454G>A 参照 Chae 等^[8]的研究报道合成引物进行 PCR 反应。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法对 TIM-1 基因 -416G>C, -1454G>A 两个启动子位点及采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对外显子 4 插入/缺失三个多态性位点进行分析。PCR 反应总体积 25 μ l, 包括 50 ng 的 DNA 模板, 0.1 mmol/L 的 dNTPs, 0.1 μ mol/L 各个引物, 0.5 mmol/L Mg-SO₄, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l 和 0.5 U 的 DNA 聚合酶。PCR 循环情况包括最初预变性 94℃ 2 min, 94℃ 变性 30 s, -1454G>A, -416G>C 和外显子 4 三个位点 30 s 退火温度分别是 60℃, 64℃, 58℃, 延长 1 min 共 30 个循环。72℃ 延长 5 min。PCR 产物采用特异性限制性内切酶进行酶切, 采用 1.5 g/dl 的琼脂糖凝胶和溴化乙锭染色后, 在凝胶成像仪上对产物进行分析。外显子 4 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (12%) 和溴化乙锭染色后进行凝胶成像分析。酶切后凝胶成像具体限制性内切酶及酶切产物, 见表 1。

表 1 TIM-1 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)
-416G>C	F1:5'-GCATGTTGTACAGGAGCATGA-3' F2:5'-GCAGACAGGCTGGTTGGTACC-3'	64	879	TaqI	879, 488, 391
-1454G>A	F1:5'-AATCATAGCCTCCAACTGC-3' F2:5'-CCCACATGCGTTAAATCG-3'	60	767	MspI	767, 522, 245
外显子 4 (157insMTTTPV)	F1:5'-TCCAGCCTGAGGCTCTTGTTT-3' F2:5'-ATGCTCATTGTTGTTGGAACAG-3'	58	201, 219		

1.4 统计学分析 利用 Arlequin 软件对病例组和对照组进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。利用 SPSS17.0 对基因型/等位基因等计数资料采用 Fisher χ^2 检验分析哮喘组和对照组的等位基因和基因型之间的统计学差异, 并分析哮喘遗传多态性的风险 (OR) 和 95% 可信区间 (95% CI)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果 两组间基因型和等位基因分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡检验 (P>0.05)。哮喘组 -416G>C 位点基因多态性的 C 等位基因明显低于对照组, 差异有统计学意义 (OR=1.682, 95% CI 1.146~2.268, P<0.05); 哮喘组 Tim-1 基因启动子区 -1454G>A 位点基因多态性与对照组比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.561$, P=0.755); 哮喘

组外显子4插入/缺失变异与对照组比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.013, P=0.602$)见,表2。

表2 TIM-1 基因多态性位点在病例组和对照组基因型、等位基因分布 [n(%)]

多态性位点	基因型/等位基因	哮喘组(n=129)	对照组(n=130)	OR(95%CI)	Fisher χ^2	P值
-416G>C	G/G	11(8.5)	5(3.8)	1.000	8.040	0.018
	G/C	67(51.9)	52(40.0)	0.586(0.192~1.790)		
	C/C	51(39.5)	73(56.2)	0.318(0.104~0.969)		
	C	169(65.5)	198(76.2)	1.000		
	G	89(34.5)	62(23.8)	1.682(1.146~2.268)		
-1454G>A	G/G	87(67.4)	93(71.5)	1.000	0.561	0.755
	G/A	38(29.5)	34(26.2)	1.195(0.691~2.065)		
	A/A	4(3.1)	3(2.3)	1.425(0.310~6.551)		
	G	212(82.2)	220(84.6)	1.000		
	A	46(17.8)	40(15.4)	1.193(0.751~1.898)		
外显子4	缺失/缺失	81(62.8)	75(57.7)	1.000	1.013	0.602
	插入/缺失	42(32.6)	50(38.5)	0.778(0.464~1.304)		
	插入/插入	6(4.7)	5(3.8)	1.111(0.326~3.793)		
	缺失	204(79.1)	200(76.9)	1.000		
	插入	54(20.9)	60(23.1)	0.882(0.582~1.338)		

3 讨论 哮喘是一种环境因素和遗传因素相互作用的多因子多基因遗传病,近年来随着基因检查水平的提高及高通量检测成本的降低,对哮喘基因的研究逐渐成为热点。我们此次选取的TIM-1基因-1454G>A,-416G>C,外显子4插入变异(157insMTTTPV)三个位点,虽然有许多国内外的报道,但是其与哮喘的关系研究结果并非一致,也尚未见有关TIM-1与我国蒙古族人群的研究报道。TIM-1基因-416G>C位点在哮喘的研究中越来越受到重视。McIntire等^[9]首先发现,在成年个体中外显子4插入变异(157insMTTTPV)基因型,其甲肝病毒感染者变应性皮炎、哮喘、过敏性鼻炎等变应性疾病的发生明显减少。但基于非洲裔美国人的病例对照研究,Gao等^[10]的研究并不支持这一结论:外显子4插入变异虽对哮喘有保护作用,但与是否存在甲肝病毒感染无关。随后,Chen等^[11]和Li等^[12]基于对亚洲国家(日本、韩国及中国)Tim-1外显子4插入/缺失变异研究均未发现与哮喘有关。我们本次试验结果也未发现外显子4插入/缺失变异对哮喘有保护作用。基于对韩国人群-416G>C位点与类风湿关节炎和哮喘的易感性研究,Chae等^[13]发现其基因多态性与哮喘无关,但与类风湿关节炎的易感性相关。基于日本人群的家系病例对照研究,Noguchi等^[14]也报道了TIM-1基因的多个多态性位点(包括-416G>C位点)与哮喘无相关性。但基于中国汉族人群的TIM-1启动子区研究,Liu等^[15]发现了一个功能性多态位点-416G>C与支气管哮喘有相关性,并且

这一多态性位点-416G>C的替换能够增强TIM-1基因的转录活性。而且最近基于中国汉族人群TIM-1变应性鼻炎的研究,Mou等^[16]发现-416G>C和-1454G>A均与变应性鼻炎有关,然而最近徐艳杰等^[17]在儿童过敏性鼻炎病例对照研究中发现,过敏性鼻炎患儿外周血中TIM-1 mRNA高表达,并且与IgE浓度密切相关,提示虽然TIM-1基因多态性与过敏性鼻炎无关,但与其基因表达产物mRNA相关,并且进一步影响IgE表达。我们此次基于蒙古族哮喘儿童的研究,也未发现-1454G>A位点与变应性哮喘有关,与Mou等^[16]的研究结果一致。Chen等^[11]对我国西南地区大样本的儿童病例对照研究证实-416G>C基因多态性与儿童哮喘有关,-1454G>A位点基因多态性与儿童哮喘无关,也与此次结论一致。对于TIM-1基因多态性与哮喘等过敏性疾病的研究虽然在人群及地区上有明显差别,但不同样本量及分析位点有可能也得到不同的结论,正是基于这种不同地区、不同人群的多样性研究为哮喘易感基因的遗传学研究提供了重要的信息。

本研究虽然证实TIM-1基因-416G>C位点基因多态性与蒙古族儿童哮喘有关,但缺乏多中心、大样本的病例对照研究及更为可靠的基于家系的大样本病例对照研究结果支持。对TIM-1基因多态性与相关疾病的研究才刚刚起步,相信随着研究的不断深入,人们对免疫性疾病的认识将有一个全新的认识。

参考文献:

- [1] 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.
- The Subspecialty Group of Respiratory Disease, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association the Editorial Board of Chinese Journal of Pediatrics. Guidelines for the diagnosis and optimal management of asthma in children(2016 Edition)[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54(3): 167-181.
- [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.
- 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.
- [3] 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.
- [4] Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, et al. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(8): 362-369.
- [5] Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. The TIM gene family: Emerging roles in immunity and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(6): 454-462.
- [6] McIntire JJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene[J]. Springer Semin Immun, 2004, 25(3/4): 335-348.
- [7] 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[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 745-753.
- The Subspecialty Group of Respiratory Disease, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, Editorial Board of Chinese Journal of Pediatrics. Guidelines for the diagnosis and optimal management of asthma in Children[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2008, 46(10): 745-753.
- [8] Chae SC, Park YR, Song JH, et al. The polymorphisms of Tim-1 promoter region are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population[J]. Immunogenetics, 2005, 56(10): 696-701.
- [9] McIntire JJ, Umetsu SE, Macaubas C, et al. Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease[J]. Nature, 2003, 425(6958): 576.
- [10] Gao PS, Mathias RA, Plunkett B, et al. Genetic variants of the T-cell immunoglobulin mucin 1 but not the T-cell immunoglobulin mucin 3 gene are associated with asthma in an African American population[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005, 115(5): 982-988.
- [11] Chen JP, Zhao WL, He NH, et al. Association of hepatitis A exposure and TIM-1 with childhood allergic asthma[J]. Journal Asthma, 2012, 49(7): 697-702.
- [12] Li JS, Liu QJ, Wang P, et al. Absence of association between two insertion/deletion coding genetic polymorphisms of TIM-1 gene and asthma in Chinese Han population[J]. International Journal of Immunogenetics, 2006, 33(6): 417-422.
- [13] Chae SC, Song JH, Heo JC, et al. Molecular variations in the promoter and coding regions of human Tim-1 gene and their association in Koreans with asthma[J]. Human Immunology, 2003, 64(12): 1177-1182.
- [14] Noguchi E, Nakayama J, Kamioka M, et al. Insertion/deletion coding polymorphisms in hHAVcr-1 are not associated with atopic asthma in the Japanese population[J]. Genes and Immunity, 2003, 4(2): 170-173.
- [15] Liu Q, Shang L, Li J, et al. A functional polymorphism in the TIM-1 gene is associated with asthma in a Chinese Han population[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2009, 144(3): 197-202.
- [16] Mou Z, Shi J, Tan Y, et al. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population[J]. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, 2010, 20(1): 3-8.
- [17] 徐艳杰, 艾亮, 谢欢. Tim-1在儿童过敏性鼻炎患者的表达及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(2): 46-48, 52.
- Xu YJ, Ai L, Xie H. Expression of Tim-1 and its clinical significance in children with allergic rhinitis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(2): 46-48, 52.