

• 基础实验研究论著 •

# IL-13 及 IL-4R $\alpha$ 基因多态性与 $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏的关联性分析\*

刘欣跃,董晓慧,刘泽菁,王 君

(兰州大学第二医院检验医学中心,甘肃兰州 730030)

**摘 要:**目的 探讨 IL-13、IL-4R $\alpha$  基因多态性与中国西北地区汉族人群  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏易感性的关联性。方法 以  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏者为研究对象,对  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏病例组 64 例及对照组 30 例进行病例对照研究,采用 Sequenom MassARRAY 分子量阵列技术平台定制 SNP 芯片技术检测 IL-13 及 IL-4R $\alpha$  的 4 个单核苷酸多态性与中国西北地区汉族人群  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏的关联性。结果 IL-13 rs20541、IL-13 rs1881457、IL-13 rs1800925 及 IL-4R $\alpha$  rs1801275 基因多态性与  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏无显著相关性( $P=0.4, 0.074, 0.074, 0.447$ )。进行性别分层后其结果比较差异仍无统计学意义( $P<0.05$ )。IL-13 的 CCT 及 CAC 单倍型在病例组和对照组中分布差异的  $P$  值分别为 0.026 和 0.069,这两种单倍型在中国西北地区汉族  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏的相关性有待进一步研究。结论 IL-13 及 IL-4R $\alpha$  基因多态性与中国西北地区汉族  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏无显著相关性。

**关键词:**  $\beta$ -内酰胺类; 抗菌药; 多态现象, 遗传; 白细胞介素类; 药物过敏

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.001

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)19-2497-03

## Correlation analysis of genetic polymorphisms of IL-13 and IL-4R $\alpha$ with $\beta$ -lactam allergy\*

Liu Xinyue, Dong Xiaohui, Liu Zejing, Wang Jun

(Department of Clinical Laboratory, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**Abstract:** **Objective** Selecting some cytokines and their receptors such as IL-13 and IL-4R $\alpha$ . Identify the relationship between these genetic polymorphisms and  $\beta$ -lactam allergy in Chinese Han population in northwest China. **Methods** We randomly selected two groups of patients with and without drug allergy against  $\beta$ -lactam with a case-control method. The number of case and control were 64 and 30. Investigate the correlation between four SNPs of IL-13 and IL-4R $\alpha$  and  $\beta$ -lactam allergy by using a newly developed genotyping assay termed iPLEX with the Sequenom MassARRAY platform. The statistical data was analyzed with the SPSS 17.0 software. Haplotypes were reconstructed using the web of SHEsis. **Results** The results showed that the SNPs of IL-13 and IL-4R $\alpha$  such as rs20541, rs1881457, rs1800925 and rs1801275 had no significant correlation with  $\beta$ -lactam allergy in Chinese Han population in northwest China. The  $P$  values of distribution of allele frequencies of the four SNPs in case and control groups are 0.4, 0.074, 0.074 and 0.447. No gender stratification was found. The Correlation between CCT and CAC haplotypes of IL-13 and  $\beta$ -lactam allergy in Chinese Han population in northwest China need further research. The  $P$  values are 0.026 and 0.069. **Conclusion** There was no significant correlation between IL-13 and IL-4R $\alpha$  genetic polymorphisms and  $\beta$ -lactam allergy in Chinese Han population in northwest China.

**Key words:** beta-lactams; anti-bacterial agents; polymorphism, genetic; interleukins; drug hypersensitivity

$\beta$ -内酰胺类抗生素常见的过敏症状有荨麻疹、血管神经性水肿、胃肠道反应、再生障碍性贫血等,严重的会引过敏性休克而导致死亡<sup>[1-5]</sup>。

T 细胞参与了各种类型的过敏反应,在  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏反应中起着重要作用<sup>[6-7]</sup>。T 细胞分 Th1 与 Th2 两种类型,当体内以 Th2 型细胞因子为主时,通过分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 等多种细胞因子参与 IgE 介导的速发型过敏反应<sup>[8]</sup>。IL-4R $\alpha$  通过激活信号转导和转录激活因子 6(signal transducer and activator of transcription, STAT6)和 GATA3 通路促进 Th2 细胞的分化和 IgE 的产生<sup>[9]</sup>。IL-13 主要通过诱导 B 细胞合成 IgE 参与变态反应<sup>[10]</sup>。IL-13 和 IL-4R $\alpha$  与特异性反应、哮喘及  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏相关<sup>[11-12]</sup>。

本研究采用 Haploview 软件选取了 IL-13 和 IL-4R $\alpha$  的四个标签单核苷酸多态性(tag single nucleotide polymorphism, tagSNP)位点,通过北京博奥生物有限公司 Sequenom Mas-

sARRAY 分子量阵列技术平台定制单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)芯片技术,检测 IL-13 的 rs20541、rs1881457、rs1800925 3 个位点及 IL-4R $\alpha$  的 rs1801275 位点与中国西北地区汉族人群  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏易感性的关联性,并进一步构建 IL-13 3 个位点的单倍型,分析其单倍型与  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏的关联性,旨在为  $\beta$ -内酰胺类抗生素过敏患者提供基因学水平的诊断数据。

### 1 材料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2007 年 1 月至 2011 年 4 月期间兰州大学第二医院住院患者中使用  $\beta$ -内酰胺类抗生素发生过敏且符合入选标准者为病例组。选择中国西北地区年龄结构、种族、性别比例均一的无亲缘关系的群体样本,且  $\beta$ -内酰胺类抗生素皮试阴性者为对照组(排除其他过敏性疾病和自身免疫性疾病患者如哮喘、湿疹、过敏性鼻炎、荨麻疹等)。其中,病例组 64 例,男性 33 例,女性 31 例;平均年龄(42.04 $\pm$ 14.4)岁。对照

\* 基金项目:甘肃省自然科学基金(1208RJZA192);甘肃省消化系肿瘤重点实验室开放课题基金,兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2011-t03-15);兰州大学第二医院内科科研项目(YJ2010-05)。 作者简介:刘欣跃,男,博士,主任检验师,主要从事药物基因组学研究。

组 30 例,男性 15 例,女性 15 例;平均年龄(41.73±6.06)岁。病例组和对照组在年龄、性别方面比较差异无统计学意义( $P=0.888$ )。根据知情同意原则,常规抽取研究对象的 EDTA 抗凝全血标本 3 mL,保存于-20℃低温冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 严格按苯酚-氯仿法说明书提取 DNA,并溶于三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA,TE)缓冲液中备用。

1.2.2 各位点的基因多态性分析 本研究选择的 SNP 分别为:IL-13 rs20541、IL-13 rs1881457、IL-13 rs1800925 及 IL-4Rα rs1801275,这 4 个位点的上下游引物由中国上海英骏生物公司合成。SNP 分型检测的主要试剂购自 SEQUENOM 公司的 iPLEX Gold Reagent Kit,该试剂盒内包含 5 U/μL Hotstar Taq 及缓冲液、25 mmol/L dNTP、1.7 U/μL SAP(shrimp alkaline phosphatase)及缓冲液,iPLEX 酶,iPLEX 延伸混合物,纯化树脂及 SpectroCHIP 质谱芯片。芯片点样采用 SEQUENOM 公司 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪;质谱检测及分析使用 SEQUENOM 公司 MassARRAY Analyzer Compact 系统。

1.2.3 多重 PCR 扩增 采用多重 PCR 扩增技术,每个反应总体积 5 μL,包含模板 DNA 10 μg,Hotstar Taq 0.5 U,扩增引物每条 0.5 pmol,25 mmol/L dNTP 0.1 μL,反应条件为 94℃ 4 min;94℃ 20 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,45 个循环;72℃ 3 min;4℃ 保存。

1.2.4 PCR 扩增产物纯化 PCR 反应产物使用 0.5 U SAP 处理,去除体系中游离的 dNTP。反应体系 7 μL,其中 PCR 产物 5 μL,SAP 混合液 2 μL(含 SAP 0.5 U,缓冲液 0.17 μL)。反应程序为 37℃ 20 min;85℃ 5 min;4℃ 保存。

1.2.5 单碱基延伸及树脂纯化 总体积 9 μL 反应体系包含 SAP 处理后 PCR 产物 7 μL,其中各延伸反应引物混合物 0.804 μL,iPLEX 酶 0.041 μL,延伸混合物 0.2 μL。反应程序为 94℃ 30 s;94℃ 5 s;52℃ 5 s,80℃ 5 s 5 个循环;返回 94℃ 5 s,总共 40 个循环;72℃ 3 min,4℃ 保存。每个延伸反应产物用 6 mg Clean Resin 树脂纯化。

1.2.6 芯片点样及质谱检测 将纯化产物移至 SpectroCHIP (Sequenom)芯片上,上机测定。SpectroCHIP 芯片使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析,检测结果使用 TYPER 4.0 软件(Sequenom)分型并输出结果。

1.3 统计学处理 基因型和等位基因频率采用基因计数法计算。各个位点的基因型频率均进行 Hardy-Weinberg 平衡检测。应用 SPSS 17.0 软件的  $\chi^2$  检验和 Fisher 精确概率法进行各基因型和等位基因频率的比较,以优势比(odd ratio,OR)及其 95%可信区间(95% confidence interval,95%CI)表示相对风险度。运用 SHEsis 在线软件分析程序进行连锁不平衡分

析(linkage disequilibrium,LD)和单倍型构建分析,网址为 <http://analysis2.bio-x.cn/myAnalysis.php>。其中, $D'$ 和  $r^2$  值用来进行连锁不平衡分析, $|D'|>0.8$  或  $r^2>0.8$  则被认为符合连锁不平衡。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组和对照组各基因位点的 Hardy-Weinberg 平衡检测结果 研究结果显示:rs20541、rs1881457、rs1800925 和 rs1801275 这 4 个 SNP 的基因型频率在病例组及对照组中的分布经检测均符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P>0.05$ )。

2.2 IL-13 及 IL-4Rα 在病例组和对照组各 SNP 位点的基因型频率及等位基因频率 IL-13 的 rs20541、rs1881457 及 rs1800925 3 个位点基因多态性与中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏敏感性的关联性在病例组与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。其中,在 rs1881457 位点中,若以野生等位基因 A 作为参照,则 C 等位基因在病例组及对照组中的分布差异无统计学意义( $P=0.074,OR=1.838,95\%CI:0.938\sim3.602$ );在 rs1800925 位点中,若以野生等位基因 C 作为参照,则 T 等位基因在病例组及对照组中的分布差异无统计学意义( $P=0.074,OR=2.95\%CI:0.928\sim4.313$ ),见表 1。男性病例组和对照组的 rs1881457 位点研究结果中发现:若以野生等位基因 A 作为参照,则 C 等位基因在病例组及对照组中比较差异无统计学意义( $P=0.083,OR=2.21,95\%CI:0.894\sim5.463$ )。IL-4Rα 的 rs1801275 基因多态性与中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏敏感性的关联性的研究结果显示:在病例组与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。将研究对象进行性别分层后,两组比较比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.3 连锁不平衡及单倍型分析结果 对 IL-13 基因 rs1881457、rs1800925 及 rs20541 这 3 个位点进行连锁不平衡分析。在中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏的人群中,rs1881457 和 rs1800925 以及 rs1800925 和 rs20541 表现为重度连锁。而 rs1881457 和 rs20541 不符合连锁不平衡。IL-13 的各位点之间的连锁度分析显示,这 3 个位点之间存在连锁不平衡,分析这些连锁不平衡对中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏产生的影响,构建单倍型。IL-13 的 rs20541、rs1881457 和 rs1800925 的分析结果共建立了 6 种单倍型,其中有 4 种单倍型在病例组和对照组中均存在,分别为 CAC、CCC、TAC 和 TCT,其  $P$  值分别为:0.068、0.5、0.928 和 0.238,所以这四种单倍型与甘肃地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏均无显著的相关性。在构建的 6 种单倍型中,CCT 单倍型只存在于对照组中,但有相应的  $P$  值, $P$  值为 0.026,但因为 CCT 在病例组中未发现,所有没有相应的  $OR$  值,其结果差异无统计学意义( $P<0.05$ )。另外,CAC 单倍型的  $P$  值为 0.069,属于边界值。

表 1 IL-13 基因位点在病例组与对照组中的基因型频率及等位基因频率分布

SNPs	基因型/等位基因	病例组[n(%)]	对照组[n(%)]	$\chi^2$	$P$	OR(95%CI)
rs20541	CC <sup>a</sup>	28(44.4)	13(43.3)	—	—	—
	CT	31(49.3)	11(36.7)	0.307	0.579	0.764(0.295~1.980)
	TT	4(6.3)	6(20)	1.676	0.196	3.231(0.776~13.446)
	C <sup>a</sup>	87(69)	39(62.8)	—	—	—
	T	39(31)	23(37.2)	0.71	0.4	1.316(0.694~2.292)

续表 1 IL-13 基因位点在病例组与对照组中的基因型频率及等位基因频率分布						
SNPs	基因型/等位基因	病例组[n(％)]	对照组[n(％)]	$\chi^2$	<i>P</i>	OR(95％CI)
rs1881457	AA <sup>a</sup>	39(60.9)	14(46.7)	—	—	—
	AC	21(32.8)	11(36.7)	0.609	0.435	1.459(0.564～3.778)
	CC	4(6.3)	5(16.6)	1.856	0.173	3.482(0.817～14.84)
	A <sup>a</sup>	99(77.3)	39(65)	—	—	—
	C	29(22.7)	21(35)	3.188	0.074	1.838(0.938～3.602)
rs1800925	CC <sup>a</sup>	46(73)	17(56.7)	—	—	—
	CT	16(25.4)	11(36.7)	1.669	0.196	1.86(0.721～4.801)
	TT	1(1.6)	2(6.6)	0.690	0.406	5.412(0.460～63.602)
	C <sup>a</sup>	108(85.7)	45(75)	—	—	—
	T	18(14.3)	15(25)	3.197	0.074	2(0.928～4.313)

<sup>a</sup>:野生型,作为参照;—:此项无数据。

3 讨 论

本研究采用病例对照的方法对 IL-13 rs20541、IL-13 rs1881457、IL-13 rs1800925 及 IL-4Rα rs1801275 位点的多态性与中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏进行了关联性分析,经 Hardy-Weinberg 平衡检测其结果不受一般人群基因多态性分布的影响,且本研究在方法上采用了基于 Sequenom MassARRAY 分子量阵列技术平台的 SNP 芯片方法,能够对样本进行高通量测序,并且其灵敏度及特异度均较高,结果可靠性好。

本研究显示,对 IL-4Rα rs1801275 位点的病例组和对照组进行比较,基因型在两组中的分布频率差异无统计学意义( $P>0.05$ ),将病例组与对照组按性别进行分层后,病例组与对照组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。对 IL-13 的 rs20541、rs1881457 及 rs1800925 3 个位点的病例组和对照组进行比较,基因型在两组中的分布频率差异无统计学意义( $P>0.05$ ),将病例组与对照组按性别进行分层后,病例组与对照组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。但是,IL-13 rs1881457 的 C 等位基因和 IL-13 rs1800925 的 T 等位基因在病例组和对照组的频率分布中  $P$  值均为 0.074,而 IL-13 基因 rs1881457 位点的 C 等位基因在男性病例组与对照组中的频率分布中  $P$  值为0.083,以上的 3 个  $P$  值均属于边界值,可能在样本量足够大时,会表现出显著的相关性,所以有必要进一步扩大样本量进行研究。

对 IL-13 的 rs20541、rs1881457 和 rs1800925 进行单倍型分析后显示:构建的 6 种单倍型中 CCT 单倍型只存在于对照组中,且  $P$  值为 0.026,但因 CCT 在病例组中未发现,所以没有相应的 OR 值,但若增加样本量,则有可能在病例组中测出相应的单倍型。另外,CAC 单倍型的  $P$  值为 0.069,属于边界值,有可能是由于样本量不够,未表现出相关性。所以关于这两种单倍型与中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏的相关性有待进一步研究。

本研究为中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏患者提供了基因学水平的诊断数据。研究显示:IL-13 rs1881457 和 rs1800925 在病例组和对照组中的等位基因频率分布差异有必要进一步扩大样本量进行研究。IL-13 的 rs20541、rs1881457 和 rs1800925 3 个位点构成的单倍型中 CCT 和 CAC 这两种单倍型与中国西北地区汉族人群 β-内酰胺类抗生素过敏的相关性也有待加大样本量进一步研究,另外有必要对这些位点进行功能定位并阐述其在 β-内酰胺类抗生素过敏发病机理中的作用。

参考文献

[1] Lagace-Wiens P,Rubinstein E. Adverse reactions to beta-lactam antimicrobials[J]. Expert Opin Drug Saf,2012,11(3):381-399.

[2] Prematta T,Shah S,Ishmael FT. Physician approaches to beta-lactam use in patients with penicillin hypersensitivity[J]. Allergy Asthma Proc,2012,33(2):145-151.

[3] Comte D,Petitpierre S,Spertini F,et al. Allergy to beta-lactam antibiotics[J]. Rev Med Suisse.2012,8(337):836,838-842.

[4] Bousquet PJ,Demoly P,Romano A. Drug allergy and hypersensitivity:still a hot topic[J]. Allergy,2009,64(2):179-182.

[5] Gomes ER,Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol,2005,5(4):309-316.

[6] Rubio M,Bousquet PJ,Demoly P. IgE-mediated anaphylaxis to pristinamycin-report of a case[J]. Allergy,2010,65(9):1198-1199.

[7] Kim SH,Choi JH,Park HS. Heterogeneity of the IgE response to allergenic determinants of cefaclor in serum samples from patients with cefaclor-induced anaphylaxis[J]. Ann Allergy Asthma Immunol,2005,94(6):700-704.

[8] Yawalkar N,Hari Y,Frutig K,et al. T cells isolated from positive epicutaneous test reactions to amoxicillin and ceftriaxone are drug specific and cytotoxic[J]. J Invest Dermatol,2000,115(4):647-652.

[9] Hershey GK,Friedrich MF,Esswein LA,et al. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor[J]. N Engl J Med,1997,337(24):1720-1725.

[10] Ford JG,Rennick D,Donaldson DD,et al. IL-13 and IFN-gamma: interactions in lung inflammation[J]. J Immunol,2001,167(3):1769-1777.

[11] Liu X,Beaty TH,Deindl P,et al. Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4,IL13,and IL4Ra in German children;the German Multicenter Atopy Study[J]. J Allergy Clin Immunol,2003,112(2):382-388.

[12] Gueant-Rodriguez RM,Romano A,Beri-Dexheimer M,et al. Gene-gene interactions of IL13 and IL4Ra variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics[J]. Pharmacogenet Genomics,2006,16(10):713-719.