

• 论 著 •

IL-17 基因多态性与支气管哮喘患儿血清 TIgE、ECP 的关系分析

陶丽芳,张 洁[△],陆利芳,顾震宇

(苏州市第九人民医院新生儿科,江苏苏州 215200)

摘 要:目的 分析白细胞介素(IL)-17 基因多态性与支气管哮喘患儿血清总 IgE (TIgE)、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)的关系。方法 将该院 2018 年 1—12 月收治的 60 例哮喘患儿设为哮喘组,同期于该院行健康体检的 60 例健康儿童设为对照组,采用 PCR-限制性片段长度多态性分析法检测 2 组 IL-17 基因多态性,采用免疫比浊法、酶联免疫吸附试验法分别检测其血清 TIgE、ECP 水平,比较 2 组 IL-17 基因多态性、TIgE 和 ECP 水平及不同基因型、不同等位基因型患儿血清 TIgE、ECP 水平。结果 哮喘组中 IL-17A-152G/A 位点中 AA 型基因频率、A 等位基因频率,IL-17F 7488T/C 位点中 TT 型基因频率、T 等位基因频率,血清 TIgE、ECP 水平均显著高于对照组($P<0.05$)。哮喘组 IL-17A-152G/A 位点 AA 型基因血清 TIgE 显著高于 AG、GG 型($P<0.05$)。IL-17A-152G/A 位点 A 等位基因携带患儿血清 TIgE 显著高于非 A 等位基因携带患儿($P<0.05$)。哮喘组 IL-17F 7488T/C 位点不同基因型、等位基因携带者间血清 TIgE、ECP 与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 IL-17A-152G/A 基因多态性与哮喘易感性有关,变异等位基因 A 携带患儿哮喘风险更高,尤其是突变纯合子 AA 基因型,野生型 TT 纯合子与哮喘也有一定关联性;且 IL-17 基因多态性虽与血清 ECP 均无明显关联,但血清 ECP 在哮喘患儿中仍明显高表达。

关键词:白细胞介素 17 基因多态性; 支气管哮喘; 血清总 IgE; 嗜酸性粒细胞阳离子蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.02.020 **中图法分类号:**R562.2;446.6

文章编号:1673-4130(2020)02-0209-04 **文献标识码:**A

Relationship between IL-17 gene polymorphism and serum TIgE and ECP in children patients with bronchial asthma

TAO Lifang, ZHANG Jie[△], LU Lifang, GU Zhenyu

(Department of Neonatology, the Ninth People's Hospital of Suzhou, Suzhou, Jiangsu 215200, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between interleukin-17 (IL-17) gene polymorphism and serum total IgE (TIgE) and eosinophil cationic protein (ECP) in children patients with bronchial asthma. **Methods** A total of 60 children patients with asthma admitted to the hospital from January 2018 to December 2018 were set as asthma group, and 60 healthy children admitted to the hospital for physical examination at the same period were set as control group. The IL-17 gene polymorphism in the two groups was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Serum TIgE and ECP were detected by immunoturbidimetry and enzyme-linked immunosorbent assay. The IL-17 gene polymorphism and levels of serum TIgE and ECP in the two groups and levels of serum TIgE and ECP of children patients with different genotypes and different allelotypes were compared. **Results** The AA genotype frequency and A allele frequency in IL-17A-152G/A locus, TT gene frequency and T allele frequency in IL-17F 7488T/C locus and levels of serum TIgE and ECP in asthma group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). The serum TIgE of AA gene in IL-17A-152G/A locus in asthma group was significantly higher than that of AG and GG ($P<0.05$). Serum TIgE of IL-17A-152G/A locus A allele carriers was significantly higher than that of non-A allele carriers ($P<0.05$). There were no statistically significant differences in the serum TIgE and ECP between asthma group and control group with different genotypes and alleles of IL-17F 7488T/C locus ($P>0.05$). **Conclusion** IL-17A-152G/A gene polymorphism is associated with asthma susceptibility. Children patients with high variant A allele has high risk of asthma, especially the homozygous AA genotype. Wild type TT homozygote is also associated with asthma. There was no significant association between IL-17 gene polymorphism and serum ECP, but serum ECP is still highly expressed in children patients with asthma.

Key words: IL-17 gene polymorphism; bronchial asthma; serum total IgE; eosinophil cationic protein

作者简介:陶丽芳,女,医师,主要从事新生儿相关疾病研究。 [△] **通信作者,** E-mail: yiting1031@163.com。

本文引用格式:陶丽芳,张洁,陆利芳,等. IL-17 基因多态性与支气管哮喘患儿血清 TIgE、ECP 的关系分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41 (2): 209-212.

支气管哮喘(简称哮喘)是儿科常见的气道慢性炎症性呼吸道疾病,主要表现为支气管痉挛、可逆性气道阻塞及气道重构,其发病机制复杂,至今仍未能完全阐明^[1]。但哮喘本身是 IgE 所介导的 I 型变态反应性疾病,其主要症状诱因多以过敏为主,当机体受体接触变应原时,B 淋巴细胞便可合成 IgE,并与其他效应细胞、肥大细胞表面的 IgE 受体结合,当再次接触变应原时,后者则与 IgE 受体复合物交联结合,触发效应细胞脱颗粒,释放组胺及其他炎性介质,导致气道高反应性并引发哮喘^[2-3]。而嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)则是嗜酸性粒细胞的特异性标志,其细胞毒性作用极强,不仅可引起气道高反应性,诱导喘息发作,并能加重变态反应炎症过程。有研究指出,IL-17 基因多态性与儿童支气管哮喘易感性具一定关联性,但研究 IL-17 基因多态性与哮喘患儿血清总 IgE(TIgE)、ECP 的临床报道相对少见^[4-5]。鉴于此,本研究着重探究 IL-17 基因多态性与哮喘患儿血清 TIgE、ECP 的关系,旨在为哮喘的临床防治提供参考意见,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将本院 2018 年 1—12 月收治的 60 例哮喘患儿纳入研究,设为哮喘组;另选取同期于本院行健康体检的 60 例健康儿童作为对照组。哮喘组男 38 例,女 22 例,年龄 6~12 岁,平均(9.74±1.20)岁;对照组男 32 例,女 28 例,年龄 6~13 岁,平均(10.01±0.97)岁。2 组研究对象性别、年龄比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.234, P=0.266; t=1.355, P=0.177$),具有可比性。

1.2 纳入、排除标准 纳入标准:(1)哮喘组患儿均符合《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》中哮喘诊断要求;(2)对照组均为健康儿童,既往亦无哮喘病史及家族史、过敏性疾病病史及家族史;(3)患儿监护人或家属知情研究内容并自愿签署知情同意书。排除标准:(1)炎症性肠道疾病;(2)哮喘以外的肺部疾病,如支气管肺扩张、肺炎等;(3)非哮喘所致的免疫功能缺陷疾病;(4)结缔组织疾病;(5)其他能引起 IL-17A-152G/A 位点、IL-17F 7488T/C 位点突变的疾病。

1.3 方法

1.3.1 IL-7 基因多态性 IL-17A-152G/A 位点(上游:5'-CAG AAG ACC TAC ATG TTA CT-3';下游:5'-GTA GCG CTA TCG TCT CTC T-3')IL-17F 7488T/C 位点(上游:5'-GTG TAG GAA CTT GGG CTG CAT CAA T-3';下游:5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3')引物均由北京鼎国生物技术有限责任公司合成。采集研究对象空腹外周静脉血后,2 500 r/min 条件下离心 5 min 后吸取上清液,置于一 20 ℃ 冰箱保存;巴氏滴管将余下凝血块捣碎并转移至液化柱 CX1 中 12 000 r/min 条件下离心 5 min,参照文献^[6]提取全血 DNA,核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度及纯度。双面超净工作台配置 PCR 反应体系,PCR 仪为 2720 Thermal lycler PCR 仪、96-

WellThermal Cycler PCR 仪;2% 琼脂糖凝胶电泳检测 IL-17A-152G/A 基因 PCR 产物;再于双面超净工作台配置 PCR 产物酶切反应体系,2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物酶切产物,G : BOX 凝胶成像系统拍照后观察保存,并分析结果。IL-17F 7488T/C 位点的多态性检测参照 L-17A-152G/A 位点。所有步骤均严格按试剂盒说明书、标准操作程序操作^[5]。

1.3.2 血清 TIgE、ECP 检测 采集研究对象的空腹外周静脉血,应用贝克曼库尔特免疫比浊试剂盒检测血清 TIgE 水平,仪器为 IMMAGR 800 特定蛋白分析仪。ECP 则采用人 ECP 酶联免疫试剂盒检测。

1.4 观察指标 统计 2 组 IL-17A-152G/A 位点、IL-17F 7488T/C 位点基因型频率及等位基因频率,比较 2 组血清 TIgE、ECP 水平及 IL-17A-152G/A 位点、IL-17F 7488T/C 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学分析软件进行统计分析,血清 TIgE、ECP 等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若符合正态分布且方差齐则采用 t 检验;符合正态分布但方差不齐采用 t' 检验;若不符合正态分布且方差不齐,则采用中位数(四分位数)描述,采用非参数秩和检验;基因多态性等计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组基因型频率及等位基因频率比较 哮喘组 IL-17A-152G/A 位点、IL-17F 7488T/C 位点基因型频数、等位基因频数频率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。哮喘组中 IL-17A-152G/A 位点中 AA 基因型频数频率、A 等位基因频数频率均显著高于对照组;IL-17F 7488T/C 位点中 TT 型基因频数频率、T 等位基因频数频率均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、2。

表 1 IL-17A-152G/A 位点基因型频率及等位基因频率 $[n(\%), n=60]$

位点	基因型			等位基因	
	AA	AG	GG	A	G
哮喘组	16(26.67)	29(48.33)	15(25.00)	29(48.33)	31(51.67)
对照组	7(11.67)	33(55.00)	20(33.33)	17(28.33)	43(71.67)
χ^2	7.038			5.076	
P	0.029			0.027	

表 2 IL-17F 7488T/C 位点基因型频率及等位基因频率 $[n(\%), n=60]$

位点	基因型			等位基因	
	AA	AG	GG	A	G
哮喘组	44(73.33)	15(25.00)	1(1.67)	50(83.33)	10(16.67)
对照组	30(50.00)	28(46.67)	2(3.33)	40(66.67)	20(33.33)
χ^2	6.912			4.444	
P	0.031			0.035	

2.2 2 组血清 TIgE、ECP 水平比较 哮喘组血清 TIgE、ECP 水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.3 IL-17A-152G/A 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 比较 哮喘组 IL-17A-152G/A 位点不同基因型血清 TIgE 比较,差异有统计学意义($P<0.05$);AA 型基因血清 TIgE 显著高于 AG、GG 型($P<0.05$),但血清 ECP 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而对照组不同基因型血清 TIgE、ECP 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.4 IL-17A-152G/A 位点不同等位基因间血清 TIgE、ECP 比较 IL-17A-152G/A 位点 A 等位基因携带患儿血清 TIgE 显著高于非 A 等位基因携带患儿,差异有统计学意义($P<0.05$),其余组内比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 4 IL-17A-152G/A 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	不同基因型间血清 TIgE(IU/mL)			不同基因型间血清 ECP(ng/mL)		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
哮喘组	459.38±345.12	281.37±225.48	266.48±219.66	59.28±27.12	60.37±54.08	63.12±57.19
对照组	66.37±48.12	68.01±64.23	56.27±40.11	57.40±21.33	41.28±20.28	37.25±17.09
t/t'	2.961	4.638	7.292	0.162	1.806	1.920
P	0.007	0.000	0.001	0.872	0.076	0.063

表 5 IL-17A-152G/A 位点位点不同等位基因间血清 TIgE、ECP 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	不同等位基因型间血清 TIgE(IU/mL)		不同等位基因型间血清 ECP(ng/mL)	
	A 等位基因	非 A 等位基因	A 等位基因	非 A 等位基因
哮喘组	331.27±320.85	266.37±230.48	62.87±40.65	66.29±53.28
对照组	67.45±61.33	56.37±40.22	43.87±30.12	55.87±41.89
t/t'	6.255	6.52	2.908	1.190
P	0.000	0.000	0.004	0.236

表 6 IL-17F 7488T/C 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	不同基因型间血清 TIgE(IU/mL)			不同基因型间血清 ECP(ng/mL)		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
哮喘组	302.17±295.48	351.39±307.28	109.48±100.12	61.27±38.10	62.45±53.87	71.11±55.37
对照组	271.38±156.29	354.74±153.11	73.08±49.84	45.18±30.37	45.41±13.09	42.27±41.60
t/t'	0.713	0.075	0.596	1.931	1.885	2.528
P	0.476	0.939	0.657	0.057	0.066	0.239

表 7 IL-17F 7488T/C 位点不同等位基因间血清 TIgE、ECP 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	不同等位基因型间血清 TIgE(IU/mL)		不同等位基因型间血清 ECP(ng/mL)	
	C 等位基因	非 C 等位基因	C 等位基因	非 C 等位基因
哮喘组	302.48±251.05	317.42±240.36	69.27±44.12	61.89±39.87
对照组	271.67±212.44	296.87±221.40	55.85±29.47	44.84±30.66
t/t'	0.726	0.487	1.959	0.881
P	0.468	0.627	0.052	0.379

2.6 IL-17F 7488T/C 位点不同等位基因间血清 TIgE、ECP 比较 哮喘组 IL-17F 7488T/C 位点不同等位基因间血清 TIgE、ECP 水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 7。

3 讨 论

近年来,哮喘易感基因已成为临床研究热点。IL-17 基因多态性被证实与多种疾病相关,如张海森等^[7]报道,IL-17A G-197A 多态性与国内汉族人群骨关节

表 3 2 组血清 TIgE、ECP 水平比较($\bar{x}\pm s,n=60$)

组别	n	TIgE(IU/mL)	ECP(ng/mL)
哮喘组	60	297.48±227.10	64.12±48.33
对照组	60	63.15±40.48	41.27±18.01
t/t'		7.868	3.431
P		0.000	0.000

2.5 IL-17F 7488T/C 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 比较 IL-17F 7488T/C 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 6。

炎的易感性相关,阳性位点 rs2275913 等位基因 G/A、G/G 是骨关节炎高风险因素,A/A 则为低风险因素。裴芳等^[8]研究显示,IL-17A 基因 rs2275913 位点 SNP 可能与中国重庆地区汉族人群病毒性心肌炎(VMC)有关,A 等位基因是 VMC 的易感基因。IL-17A 基因、IL-17F 基因均位于 6p12,长度分别为 4 252 bp、7 815 bp。前者是极具潜力的与哮喘易感性有关的候选基因,其 SNP 位点多位于非编码区,与后

者不仅在结构上极为相似,在调控、信号通路上也非常相似。既往有研究指出,IL-17A、IL-17F 可形成同源二聚体及异二聚体并发挥相应功能^[9]。

本研究所分析的 IL-17A-152G/A 位点、IL-17F 7488T/C 位点分别为 IL-17A 基因启动子区域、第 3 个外显子区。结果显示,哮喘组中 IL-17A-152G/A 位点中 AA 型基因频数频率、A 等位基因频数频率, IL-17F 7488T/C 位点中 TT 型基因频数频率、T 等位基因频数频率均显著高于对照组($P<0.05$),提示变异等位基因 A 携带患儿哮喘风险更高,尤其是突变纯合子 AA 基因型,野生型 TT 纯合子与哮喘也有一定关联性,有 C 等位基因患儿或具有更低的哮喘风险。这与罗萨^[10]的报道结论存在一定差异,其认为 IL-17A-152G/A 位点基因多态性与哮喘无明显相关性,基于研究在样本数量上的差异性,IL-17A-152G/A 位点基因多态性与哮喘的关系仍有待采集更大样本量、设计更严谨的研究方案后进一步补充及完善。

TIgE 则可与炎症细胞结合后释放多种生物活性介质,引起支气管平滑肌收缩,增加黏液分泌及血管通透性,引起炎症细胞浸润,最终并发一系列哮喘症状^[11-12]。而 ECP 作为单链碱性含糖蛋白质,主要由 EOS 活化、中性粒细胞活化后释放,是具细胞毒性、纤维化的多功能蛋白物质,在变态反应中发挥重要作用,既往研究亦指出其可引起气道上皮细胞受损、脱落基底膜及平滑肌增厚等多种病理生理改变,最终导致气道反应性增高、支气管痉挛及肺功能受损^[13-14]。本研究显示,哮喘组患儿 TIgE、ECP 水平显著高于对照组,进一步分析不同基因型患儿血清 TIgE、ECP 水平,结果显示哮喘组 IL-17A-152G/A 位点 AA 型基因血清 TIgE 显著高于 AG、GG 型,但血清 ECP 比较差异无统计学意义,提示 IL-17A 基因突变纯合子-152AA 基因型或与血清 TIgE 升高有关,A 等位基因携带患儿血清 TIgE 升高更显著,这与曾艳^[15]的报道结论相似。同时,虽哮喘患儿在 IL-17F 7488T/C 位点基因型分布、血清 TIgE 及 ECP 水平上与对照组比较差异有显著性,但 IL-17F 7488T/C 位点不同基因型间血清 TIgE、ECP 比较差异无统计学意义,提示 IL-17F 7488T/C 位点与血清 TIgE、ECP 无明显关联。

4 结 论

综上所述,IL-17A-152G/A 基因多态性与哮喘易感性有关,变异等位基因 A 携带患儿哮喘风险更高,尤其是突变纯合子 AA 基因型,野生型 TT 纯合子与哮喘也有一定关联性,值得临床重视。但基于本研究在样本数量上的局限性,部分基因型分布例数不足 10 例,可能存在一定统计学误差。因此,IL-17 基因多态性与哮喘患儿血清 TIgE、ECP 的相关性仍有待扩大样本量后深入探究。

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.

[2] CRESPO-LESSMANN A,MATEUS E,VIDAL S,et al. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in subjects with asthma by total serum IgE level[J]. Respir Res,2016,17(1):41-46.

[3] FENG J,ZHANG C,WANG Z,et al. Association between CD14 gene promoter polymorphisms with serum total-IgE and eosinophil levels in atopic and non-atopic asthma patients in a Chinese Han population[J]. J Asthma,2016,53(2):119-124.

[4] 刘志明,欧阳若芸. 白细胞介素 17 基因启动子区多态性与儿童哮喘易感性的相关性[J]. 医学临床研究,2016,33(1):155-157.

[5] 穆里斯 K B,费里 F,吉布斯 R. PCR 聚合酶链式反应[M]. 北京:科学出版社,1997:121-140.

[6] 黄华佗,王荣,陆玉兰,等. IL-17A 基因 rs3819024 和 rs8193037 单核苷酸多态性与缺血性脑卒中的相关性[J]. 中华医学遗传学杂志,2018,35(6):883-886.

[7] 张海森,白玉明,靳胜利,等. 白细胞介素-17 基因多态性与骨关节炎易感性之间的相关性研究[J]. 中华骨科杂志,2016,36(22):1450-1455.

[8] 裴芳,裴华,权云帆,等. IL-17A 基因多态性及血浆水平与病毒性心肌炎的相关性研究[J]. 临床心血管病杂志,2017,33(6):63-66.

[9] IBOSHI Y,NAKAMURA K,FUKAURA K,et al. Erratum to: increased IL-17A/IL-17F expression ratio represents the key mucosal T helper/regulatory cell-related gene signature paralleling disease activity in ulcerative colitis[J]. J Gastroenterol,2017,52(3):1-10.

[10] 罗萨. 白细胞介素 17G-152A 基因多态性与支气管哮喘的相关性研究[D]. 大连:大连医科大学,2013.

[11] ALVAREZ PUEBLA M J,AROABARREN A E,CORCUERA G A,et al. Blood eosinophils,fraction of exhaled nitric oxide,and serum eosinophil cationic protein as surrogate markers for sputum eosinophils in asthma: influence of treatment with inhaled corticosteroids[J]. J Investigat Allergol Clin Immunol,2018,28(3):210-212.

[12] PARK H J,KIM E J,YOON D,et al. Prevalence of self-reported allergic diseases and IgE levels: a 2010 KNHANES analysis [J]. Allergy Asthma Immunol Res,2017,9(4):329-339.

[13] LORENZO G D,MANSUETO P,MELLUSO M,et al. Serum levels of total IgE and soluble CD23 in bronchial asthma[J]. Mediat Inflamm,2014,5(1):43-46.

[14] SIGURS N,BJARNASON R,SIGURBERGSSON F. Eosinophil cationic protein in nasal secretion and in serum and myeloperoxidase in serum in respiratory syncytial virus bronchiolitis: relation to asthma and atopy[J]. Acta Paediatr,2015,83(11):1151-1155.

[15] 曾艳. 贵阳地区 224 例哮喘患儿 IL-17 基因多态性及其与血清 TIgE、ECP 水平的相关性[D]. 贵阳:贵阳医学院,2015.