

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.03.011

论著·临床研究

IL1R1 基因多态性与儿童哮喘的相关性

刘燕 刘晟 吴宏辉 张翔

(咸宁市中心医院儿科, 湖北 咸宁 437100)

[摘要] **目的** 探讨我国中部地区儿童 IL1R1 基因的两个 SNP 位点 (rs1558641 和 rs949963) 的多态性与哮喘易感性的相关性。**方法** 采用病例-对照的研究方法, 选取来自于我国中部地区的 208 例哮喘患儿 (哮喘组) 和 223 例同时体检正常的儿童 (健康对照组) 作为研究对象。利用限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 的方法检测 IL1R1 基因两个 SNP 位点 (rs1558641 和 rs949963) 的多态性分布; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血清中 IL1R1 的水平。**结果** 哮喘组患儿 SNP 位点 (rs1558641) 的基因型及等位基因频率与健康对照组相比差异无统计学意义。而哮喘组患儿 SNP 位点 (rs949963) GG 基因型的比例显著高于健康对照组 ($P=0.031$), 且两组等位基因频率差异也有统计学意义 ($P=0.018$)。哮喘组血清 IL1R1 的水平明显高于健康对照组 ($P=0.011$), 且 SNP 位点 (rs949963) GG 基因型的患儿血清 IL1R1 水平高于其他基因型 (AA+AG) 的患儿 ($P=0.028$)。**结论** IL1R1 基因 SNP 位点 (rs949963) 的多态性与我国中部地区儿童哮喘的易感性相关, 且该位点的多态性可能影响患儿血清中 IL1R1 的表达水平。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(3): 243-246]

[关键词] 哮喘; IL1R1 基因; 易感性; 儿童

Association between IL1R1 gene polymorphisms and childhood asthma

LIU Yan, LIU Sheng, WU Hong-Hui, ZHANG Xiang. Department of Pediatrics, Xianning Central Hospital, Xianning, Hubei 437100, China (Liu S, Email: liusheng_86@126.com)

Abstract: Objective To investigate the association of two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in IL1R1 gene (rs1558641 and rs949963) with the susceptibility to asthma in children from Central China. **Methods** A case-control study was performed in the asthma group and the control group, consisting of 208 children with asthma and 223 normal children from Central China, respectively. The genotypes of two SNPs in IL1R1 gene, rs1558641 and rs949963, were identified using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The serum level of IL1R1 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** There were no significant differences in genotype and allele frequencies of rs1558641 between the asthma and control groups. In terms of rs949963, the frequencies of GG genotype and alleles were significantly higher in the asthma group than in the control group ($P<0.05$). The asthma group had a significantly higher serum level of IL1R1 than the control group ($P=0.011$). Moreover, the serum level of IL1R1 was significantly higher in patients with GG genotype than in those with AA or AG genotype for rs949963 ($P=0.028$). **Conclusions** IL1R1 SNP rs949963 is associated with the susceptibility to asthma in children from Central China and may increase the serum expression of IL1R1. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(3): 243-246]

Key words: Asthma; IL1R1 gene; Susceptibility; Child

哮喘是一种有多种细胞和炎性介质以及细胞因子参与的, 以慢性气道炎症和气道高反应性为主要特征的变态反应性疾病。随着社会发展、人们生活环境以及生活模式的改变, 近些年来儿童哮喘发病率在全球范围内有逐渐上升的趋势^[1]。儿

童哮喘既受环境因素的影响又受遗传因素的影响, 国内外均有研究发现多种基因与哮喘的易感性相关^[2], 如 CHI3L1 基因^[3]、CRTH2 基因^[4]、CDHR3 基因^[5]等, 国外 Klaus 等^[5]发现 IL1R1 基因与哮喘的遗传易感性存在相关性, 国内暂未见该基因

[收稿日期] 2015-12-06; [接受日期] 2016-01-08

[作者简介] 刘燕, 女, 本科, 主管护师。

[通信作者] 刘晟, 女, 副主任医师。

与哮喘的相关性研究,由于种族及人群差异,本研究探讨 IL1R1 基因的 SNP 位点(rs1558641 和 rs949963)的多态性与我国中部地区儿童哮喘的易感性是否相关,以进一步揭示哮喘的遗传学发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

将 2013 年 6 月至 2015 年 6 月在我院儿科住院治疗的 208 例哮喘患儿纳入本研究,其中男性患儿 114 例,女性患儿 94 例;年龄 2 岁 5 个月至 9 岁 7 个月(4 ± 3 岁)。病例入选标准:(1)符合中华医学会儿科学分会呼吸学组制定的支气管哮喘诊断标准^[6];(2)排除先天性心肺疾病、自身免疫性疾病、遗传性疾病等。收集同时期在我院体检正常的 223 名儿童作为健康对照组,其中男 118 例,女 105 例;年龄 2 岁 6 个月至 10 岁(4 ± 3 岁);均排除了各系统的疾病。哮喘组与健康对照组在年龄及性别比例上差异无统计学意义(分别 $P=0.315$ 、 0.694)。两组儿童均来自于我国中部地区。本研究得到患儿家属知情同意以及医院医学伦理委员会的批准。

1.2 IL1R1 基因多态性分析

抽取两组儿童静脉血 2 mL,利用酚氯仿抽提乙醇沉淀的方法提取基因组 DNA。以 DNA 为模版利用引物 F1(GAGAACAGACGGCAGTAAAAGC)和 R1(CATTTACTCATTACTCCATGGGAAG)扩增含有 SNP(rs1558641)的片段;利用引物 F2(GGATACTTTCAGGAAATCAAATCACAG)和 R2(CTGGCCTCTAGTACATTTCTTTCTG)扩增含有 SNP(rs949963)的片段。PCR 总反应体系为 25 μ L,含有 10 倍 PCR 反应缓冲液 2.5 μ L,10 mM dNTP 混合液 1 μ L,10 μ M 引物各 1 μ L,TAKARA 公司 Taq 酶 1 U(5 U/ μ L);反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个

循环。分别取 5 μ L 扩增的产物利用内切酶 HindIII(TAKARA 公司)以及 Pml I(TAKARA 公司)进行酶切,然后利用 2.5% 琼脂糖电泳分析。

1.3 血清 IL1R1 水平的测定

收集哮喘组患儿急性期及健康对照组的外周静脉血后,离心收集血清,利用 ELISA 试剂盒(USCN 公司)测定血清中 IL1R1 的水平。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计分析。频率计数法计算哮喘组和健康对照组基因型和等位基因频率,利用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验各组是否具有群体代表性。各组间基因型频率分布和等位基因频率分布比较采用 χ^2 检验;计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用成组 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL1R1 基因 SNP 位点基因型的确定及频率分布

哮喘组及健康对照组均利用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,均符合该定律($P > 0.05$),说明两组均具有群体代表性。该基因 SNP 位点 rs1558641 的基因型确定的方法为 PCR 产物经酶切电泳后 GG 基因型显示 159 bp 条带,AA 基因型显示 133 bp 的电泳条带,而 AG 基因型显示以上两条带(图 1)。SNP 位点 rs949963 经酶切以后 AA 基因型显示 187 bp 的条带,GG 基因型显示 147 bp 的条带,AG 基因型显示以上两条带(图 1)。统计结果显示,哮喘组 SNP 位点(rs1558641)的 3 种基因型及等位基因分布与健康对照相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。而哮喘组 SNP 位点(rs949963)的 3 种基因型与健康对照组相比差异具有统计学意义($P=0.031$),等位基因频率差异也具有统计学意义($P=0.018$),G 等位基因为风险因子($OR=1.461$),见表 2。

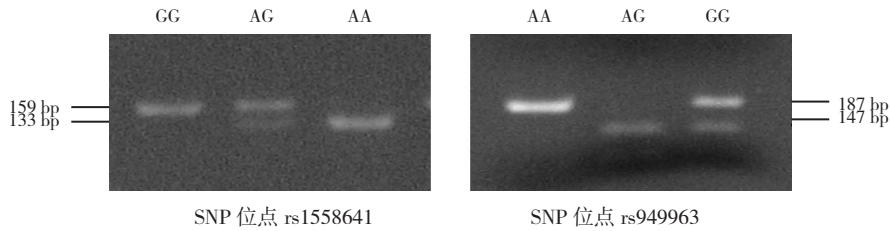


图1 IL1R1 基因两个 SNP 位点基因型的确定 SNP 位点 rs1558641 的 3 种基因型别为: GG、AG 和 AA; SNP 位点 rs949963 的 3 种基因型为: AA、AG 和 GG。

表1 IL1R1 基因 SNP 位点 (rs1558641) 的基因型及等位基因频率分布 [n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	AG	AA	G	A
健康对照组	223	105(47.1)	103(46.2)	15(6.7)	313(70.2)	111(26.7)
哮喘组	208	108(51.9)	89(42.8)	11(5.3)	305(73.3)	133(29.8)
χ^2 值			1.158		1.044	
OR(95%CI)		1.403(0.616~3.194)	1.178(0.515~2.679)	1.000	1.168(0.867~1.572)	
P 值			0.561		0.307	

表2 IL1R1 基因 SNP 位点 (rs949963) 的基因型及等位基因频率分布 [n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		GG	AG	AA	G	A
健康对照组	223	113(50.7)	97(43.5)	13(5.8)	323(72.4)	86(20.7)
哮喘组	208	126(60.6)	78(37.5)	4(1.9)	330(79.3)	123(27.6)
χ^2 值			7.021		5.588	
OR(95%CI)		3.624(1.149~11.434)	2.613(0.821~8.333)	1.000	1.461(1.066~2.003)	
P 值			0.031		0.018	

2.2 不同基因型患儿血清中 IL1R1 水平的测定

哮喘组血清 IL1R1 水平 (0.78 ± 0.42 pg/mL) 高于健康对照组 (0.53 ± 0.21 pg/mL), 差异具有统计学意义 ($t=2.643, P=0.011$)。SNP 位点 (rs949963) GG 基因型的哮喘患儿血清 IL1R1 的水平为 0.84 ± 0.39 pg/mL, 其他基因型 (AA+AG) 的患儿 IL1R1 的水平为 0.59 ± 0.25 pg/mL, 两者比较差异具有统计学意义 ($t=2.292, P=0.028$)。

3 讨论

支气管哮喘是儿童最常见的慢性呼吸道疾病, 该疾病反复发作, 严重影响儿童的健康与学习生活。近年来, 世界各国儿童哮喘的患病率不断上升; 我国儿科哮喘协作组进行的全国规模的儿童哮喘患病率调查显示我国儿童哮喘的患病率也存在上升的趋势^[7]。哮喘作为一种多因素复杂性疾病, 其

发病与遗传基因以及生长环境因素有关, 目前全基因组关联研究发现 200 多个与哮喘相关的基因, 且部分基因在多个人群中得到验证^[5]。

IL1R1 基因位于 2 号染色体 q12 区域, 含有 23 个外显子, 编码 IL1R1 细胞因子, 该蛋白属于 IL-1 受体家族, 是 IL-1 α 、IL-1 β 以及 IL-1RA 的受体^[8]; 研究表明 IL1R1 蛋白可与 PIK3R1、Myd88 蛋白以及 IL1RAP 等相互作用在调节细胞代谢以及许多细胞因子诱导的免疫及炎症反应中发挥重要作用^[9-11]。

本研究显示哮喘组患儿血清中 IL1R1 因子水平高于健康对照组儿童, 推测可能的原因为哮喘是由于多种炎症细胞及细胞因子相互作用导致的气道炎症反应^[1], 巨噬细胞在一些因子的刺激下产生大量的 IL-1 α 、IL-6 以及 TNF- α ^[12], 过量的 IL-1 导致机体内 IL1R1 水平的升高。

SNP 位点 (rs1558641) 位于 IL1R1 基因 5'

端的非编码区, 本研究发现该基因的多态性与哮喘的易感性不相关, 推测该位点虽然位于 IL1R1 基因的启动子区域, 但不影响该基因的转录翻译过程。国外有研究小组发现 IL1R1 基因的该位点与哮喘的发病相关^[5], 本研究结果与之存在差异, 可能的原因是人群及种族的差异或者是本研究纳入的样本量较小所导致。

本研究显示, SNP 位点 (rs949963) 的基因型频率与健康对照相比存在显著差异, G 等位基因为风险因子; 且 ELISA 的结果显示 GG 基因型的患儿血清中 IL1R1 因子的水平高于其他基因型的患儿, 提示携带 GG 基因型的人群患哮喘的风险更大。该位点位于 IL1R1 基因的内含子区域, 该 SNP 位点的多态性与 IL1R1 基因的表达水平相关, 推测可能的原因为该位点与调节该基因转录翻译的位点存在连锁效应, 但进一步的分子机制需要进一步研究。

综上所述, 本研究发现 IL1R1 基因 SNP 位点 (rs949963) 的多态性与我国中部地区儿童哮喘的易感性相关, 且该多态性影响患儿血清中 IL1R1 的水平, 该结论对进一步认识哮喘的致病机制提供了帮助。但本研究仍存在一定的局限性, 即本研究为单中心研究, 样本量较小, 今后应进行多地区、多种族、多中心的进一步分析, 并在细胞及动物水平进一步阐述哮喘的发病机制。

[参 考 文 献]

[1] Daley D, Park JE, He JQ, et al. Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(6): 1284-1293.

[2] Ferreira MA, Matheson MC, Tang CS, et al. Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(6): 1564-1571.

[3] 李基明, 张慧芬, 沈晓丽. CHI3L1 基因单核苷酸多态性与儿童哮喘易感性的相关性研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(2): 144-148.

[4] Campos Alberto E, Maclean E, Davidson C, et al. The single nucleotide polymorphism CRTh2 rs533116 is associated with allergic asthma and increased expression of CRTh2[J]. *Allergy*, 2012, 67(11): 1357-1364.

[5] Klaus B, Patrick S, Kasper N, et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(1): 51-55.

[6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 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.

[7] 全国儿科哮喘协作组. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(10): 729-732.

[8] Müller M, Herrath J, Malmström V. IL-1R1 is expressed on both Helios(+) and Helios(-) FoxP3(+) CD4(+) T cells in the rheumatic joint[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 182(1): 90-100.

[9] Reddy SA, Huang JH, Liao WS. Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(46): 29167-29173.

[10] Hung CY, Jiménez-Alzate Mdel P, Gonzalez A, et al. Interleukin-1 receptor but not Toll-like receptor 2 is essential for MyD88-dependent Th17 immunity to *Coccidioides* infection[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(5): 2106-2114.

[11] Acuner Ozbabacan SE, Gursoy A, Nussinov R, et al. The structural pathway of interleukin 1 (IL-1) initiated signaling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer[J]. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(2): e1003470.

[12] Jin Y, Liu L, Zhang S, et al. Cadmium exposure to murine macrophages decreases their inflammatory responses and increases their oxidative stress[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 168-175.

(本文编辑: 邓芳明)