

论著·临床研究

湖南省98例哮喘儿童ORMDL3基因多态性分析及与OPN、TGF-β1水平相关性探讨

阳爱梅¹ 黄榕¹ 金世杰²

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南长沙 410008; 2. 湖南省儿童医院呼吸科, 湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 研究湖南省哮喘儿童ORMDL3基因多态性, 并探讨其与骨桥蛋白(OPN)及转化生长因子β1(TGF-β1)的相关性。**方法** 收集湖南省的哮喘患儿($n=98$, 哮喘组)及非哮喘儿童($n=30$, 对照组)外周血, 其中哮喘组又分为伴特应质($n=62$)和无特应质亚组($n=36$), 进行ORMDL3基因单核苷酸多态性分析并检测OPN和TGF-β1含量。**结果** 哮喘组与对照组ORMDL3基因rs7216389位点的基因型及等位基因构成比差异无统计学意义。哮喘组OPN含量高于对照组($P<0.05$), 其中伴特应质及无特应质亚组的OPN含量也明显高于对照组($P<0.05$); 伴特应质哮喘组血清TGF-β1含量高于对照组($P<0.05$)。不同基因型哮喘患儿的OPN及TGF-β1含量差异均无统计学意义。哮喘组及其两个亚组的OPN与TGF-β1含量均呈直线正相关($r=0.620, 0.734, 0.649, P<0.01$)。**结论** ORMDL3基因rs7216389单核苷酸多态性与湖南省哮喘儿童无相关性; OPN、TGF-β1参与了哮喘的发生发展过程; ORMDL3基因rs7216389位点并不影响OPN、TGF-β1的表达, 可能与气道重塑无明显相关性。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(4): 324-328]

[关键词] 哮喘; ORMDL3基因; 特应质; 单核苷酸多态性; 骨桥蛋白; 转化生长因子β1; 儿童

ORMDL3 polymorphisms and their relationship with OPN and TGF-β1 levels in children with asthma in Hunan, China: an analysis of 98 cases

YANG Ai-Mei, HUANG Rong, JIN Shi-Jie. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008 China (Huang R, Email: 1211817976@qq.com)

Abstract: Objective To investigate ORMDL3 polymorphisms in children with asthma in Hunan, China, and to determine the relationship between ORMDL3 polymorphisms and serum osteopontin (OPN) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) levels. **Methods** Peripheral blood samples were collected in children with asthma ($n=98$; asthma group) or without asthma ($n=30$; control group) from Hunan, China. The asthma group was subdivided into atopic ($n=62$) and non-atopic ($n=36$) subgroups. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis was performed, and serum OPN and TGF-β1 levels were measured. **Results** There were no significant differences in genotype and allele frequencies of rs7216389 of the ORMDL3 gene between the asthma and control groups. The serum level of OPN in the asthma group was significantly higher than in the control group ($P<0.05$). Both the atopic and non-atopic subgroups showed increased serum levels of OPN compared with the control group ($P<0.05$). The serum level of TGF-β1 in the atopic subgroup was significantly higher than in the control group ($P<0.05$). The serum levels of OPN and TGF-β1 showed no significant differences in asthmatic children with different genotypes. The serum levels of OPN and TGF-β1 were in a positive linear correlation in the asthma group ($r=0.620; P<0.01$) and its two subgroups ($r=0.734, 0.649$ respectively; $P<0.01$). **Conclusions** In children from Hunan, China, the SNP (rs7216389) of ORMDL3 is not related to asthma susceptibility. OPN and TGF-β1 may be involved in the development of asthma, and they are in a positive linear correlation. The SNP (rs7216389) of ORMDL3 does not influence the expression of OPN and TGF-β1, suggesting that it may not be associated with airway remodeling.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(4): 324-328]

Key words: Asthma; ORMDL3 gene; Atopic status; Single nucleotide polymorphism; Osteopontin; Transforming growth factor-β1; Child

[收稿日期] 2015-10-24; [接受日期] 2016-01-28

[作者简介] 阳爱梅, 女, 硕士, 医师。现工作单位: 广东省人民医院儿科。

[通信作者] 黄榕, 女, 教授。

支气管哮喘（简称哮喘）是全球常见的慢性
疾病之一，可发生于各年龄段人群。调查显示，
我国儿童哮喘发病率已由 1.5% 升至 3% 左右，
个别地区已达到 7.45%^[1]。2007 年 Moffatt 等^[2]
第一次证实了 ORMDL3 基因多态性与儿童哮喘易
感性相关，携带该基因遗传变异的儿童哮喘风险
增加 60%~70%。刘丽红等^[3]发现，ORMDL3 基因
rs7216389 多态性与中国成人和儿童哮喘易感均有
相关性。近年来研究提示，哮喘发展过程并非完
全可逆，长期反复发作可导致气道重塑并难以逆
转^[4]。目前研究较多的与气道重塑密切相关的细胞
因子是骨桥蛋白（osteopontin, OPN）和转化生长因
子 $\beta 1$ （transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$ ）。本
研究从基因水平对 ORMDL3 基因 rs7216389 位点
进行单核苷酸多态性分析，以探讨湖南地区汉族
儿童哮喘的 ORMDL3 基因多态性及与特应质间的
关系，并分析其与 OPN、TGF- $\beta 1$ 的相关性，以期
从遗传学及免疫学角度探讨哮喘的发病机制，为
哮喘的筛查提供早期诊断方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 12 月至 2011 年 10 月来自湖南
省不同地区在湖南省儿童医院诊断为哮喘的住院
儿童 98 例（哮喘组），均符合《儿童支气管哮喘
诊断和防治指南》^[5]的诊断标准。年龄 0~5 岁（ 2.2 ± 1.6 岁）。根据哮喘儿童及其 3 代直系亲属有无
过敏性疾病（包括湿疹、过敏性鼻炎、过敏性
皮炎、荨麻疹、食物药物过敏及其他过敏性疾
病），分为伴特应质和无特应质哮喘亚组：伴
特应质组 62 例，无特应质组 36 例。随机选取
同期湖南省儿童医院小儿外科住院的 0~5 岁儿
童 30 例为对照组，年龄 0~5 岁（ 1.9 ± 1.4 岁），
均无哮喘及上述过敏性疾病史，且均无过敏性疾
病家族史。本研究获得医院医学伦理委员会批准
及家长知情同意。

1.2 标本采集

采集两组儿童外周静脉血 2 mL，其中 1 mL
全血置于乙二胺四乙酸二钾（EDTA-K2）抗凝试
管充分摇匀，于 -70°C 冰箱冻存备用，用于提取
基因组 DNA；1 mL 用于分离血清，将所得血清置

于 -70°C 冰箱冻存，用于检测 OPN 和 TGF- $\beta 1$ 含量。
哮喘组均在急性发作期采集血标本，且近 2 周内
均未使用过全身激素。

1.3 模板 DNA 的提取

采用北京鼎国有限公司生产的全血微量 DNA
提取试剂盒，按照说明书进行白细胞基因组 DNA
提取。 -20°C 保存备用。

1.4 基因组 DNA 的 PCR 扩增

引物由上海英竣生物技术公司合成，上游引
物：GGTGGCAACTGACTCAGAAC，下游引物：
CAACCTGGCCAACATGGTGA。PCR 扩增体系：
Forward primer（ $5 \mu\text{M}$ ）及 Reverse primer（ $5 \mu\text{M}$ ）各
 $1.0 \mu\text{L}$ ，dNTP Mixture $12.5 \mu\text{L}$ ，提取所得 DNA 模板
 $2.0 \mu\text{L}$ ，最后加 ddH₂O 至总体积 $25.0 \mu\text{L}$ 。PCR 扩
增条件： 94°C 预变性 5 min， 94°C 变性 30 s， 55°C
退火 30 s， 72°C 延伸 30 s，循环 35 次，之后 72°C
延伸 5 min，再 4°C 恒温。

1.5 PCR 扩增产物的纯化、回收及测序

采用 AXYGEN 公司生产的试剂盒，按照说
明书进行 PCR 产物纯化、回收，并将纯化所得的
DNA 进行测序分析。

1.6 细胞因子 OPN、TGF- $\beta 1$ 含量的检测

采用酶联免疫吸附法（ELISA）测定血清细胞
因子 OPN、TGF- $\beta 1$ ，实验步骤按试剂盒说明进行，
根据光密度值来计算细胞因子的含量。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 17.0 进行统计分析，计量资料以均
数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组比较采用单因素
方差分析，组间两两比较采用 Tukey 法；计数资
料以率（%）表示，组间比较采用卡方检验；相关
性分析采用 Pearson 相关分析法；基因频率分布采
用 Hardy-Weinberg 平衡检验。 $P < 0.05$ 为差异有统
计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

哮喘组 98 例中，男性 72 例、女性 26 例，
对照组 30 例中男性 25 例、女性 5 例。两组的
性别（ $\chi^2=1.218$ ， $P=0.270$ ）、年龄（ $F=0.874$ ，
 $P=0.384$ ）构成比差异无统计学意义。哮喘两个亚
组与对照组的性别（ $\chi^2=1.290$ ， $P=0.525$ ）和年龄

($F=2.095$, $P=0.127$) 构成比差异无统计学意义。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

哮喘组和对照组在扩增的 335 bp 长度的序列中, 发现 ORMDL3 基因 rs7216389 位点可见 AA、AG 和 GG 3 种基因型, 以 AA 纯合子基因型比例较高。采用拟和优度卡方检验分析基因型分布, 符合 Hardy-Weinberg 平衡吻合度 ($P>0.05$), 表明所调查的群体达到了遗传平衡, 具有群体代表性。

2.3 ORMDL3 基因多态性在各组中的分布

哮喘组与对照组基因型及等位基因构成比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 对照组和哮喘组的基因位点多态性分布比较

[n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
对照组	30	18(60)	8(27)	4(13)	44(73)	16(27)
哮喘组	98	67(68)	23(24)	8(8)	157(80)	39(20)
χ^2 值		0.994			1.248	
P 值		0.608			0.264	

哮喘伴特应质组与哮喘无特应质组的基因型及等位基因构成比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 伴特应质组和无特应质组的基因位点多态性分布比较

[n (%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
无特应质组	36	23(64)	9(25)	4(11)	55(76)	17(24)
伴特应质组	62	44(71)	14(23)	4(7)	102(82)	22(18)
χ^2 值		0.829			0.984	
P 值		0.608			0.321	

2.4 各组血清 OPN 及 TGF- β 1 含量比较

哮喘组 OPN 血清含量明显高于对照组 ($P<0.05$), 其中伴特应质组及无特应质组的 OPN 含量也明显高于对照组 ($P<0.05$); 而哮喘无特应质组与伴特应质组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

哮喘组血清 TGF- β 1 含量明显高于对照组 ($P<0.05$), 其中伴特应质组 TGF- β 1 含量明显高于无特应质组和对照组 ($P<0.05$), 无特应质组和

对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 各组血清 OPN 及 TGF- β 1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	OPN (ng/mL)	TGF- β 1 (pg/mL)
对照组	30	14 \pm 4	47 \pm 24
哮喘组	98	19 \pm 5 ^a	70 \pm 32 ^a
无特应质	36	19 \pm 4 ^a	54 \pm 22
伴特应质	62	19 \pm 6 ^a	79 \pm 33 ^{ab}

注: [OPN] 骨桥蛋白。a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与无特应质组比较, $P<0.05$ 。

对不同基因型哮喘儿童的血清 OPN 及 TGF- β 1 的含量进行比较, 不同组别、基因型之间的 OPN、TGF- β 1 细胞因子水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 4。

表 4 各组不同基因型的 OPN、TGF- β 1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	基因型	例数	OPN (mg/mL)	TGF- β 1 (pg/mL)
对照组	AA	18	14 \pm 3	46 \pm 22
	AG	8	13 \pm 4	45 \pm 27
	GG	4	13 \pm 4	56 \pm 30
	F 值		0.158	0.284
	P 值		0.855	0.755
哮喘组	AA	67	19 \pm 5	70 \pm 33
	AG	23	19 \pm 5	69 \pm 26
	GG	8	17 \pm 5	67 \pm 41
	F 值		0.355	0.039
	P 值		0.702	0.962
伴特应质组	AA	44	19 \pm 5	80 \pm 34
	AG	14	19 \pm 5	76 \pm 25
	GG	4	18 \pm 6	82 \pm 48
	F 值		0.119	0.086
	P 值		0.888	0.918
无特应质组	AA	23	19 \pm 3	53 \pm 20
	AG	9	19 \pm 4	58 \pm 26
	GG	4	17 \pm 3	52 \pm 31
	F 值		0.534	0.218
	P 值		0.591	0.805

哮喘组血清中 OPN 含量与 TGF- β 1 含量呈正相关 ($r=0.620$, $P<0.01$), 其中哮喘无特应质组与伴特应质组的血清 OPN 含量与 TGF- β 1 含量亦呈正相关 (r 分别为 0.734 和 0.649, 均 $P<0.01$)。见图 1~3。对照组的血清 OPN 含量与 TGF- β 1 含量无相关性 ($r=-0.226$, $P=0.231$)。

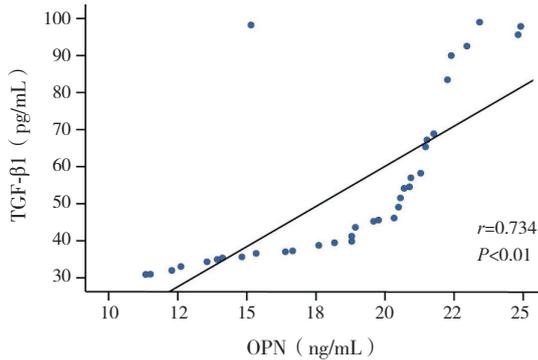


图1 哮喘无特应质组血清 OPN 与 TGF-β1 的相关性

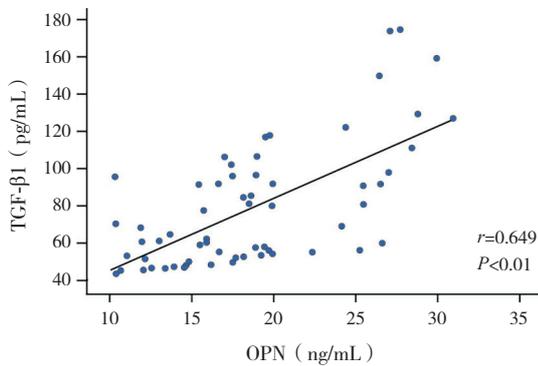


图2 哮喘伴特应质组血清 OPN 与 TGF-β1 的相关性

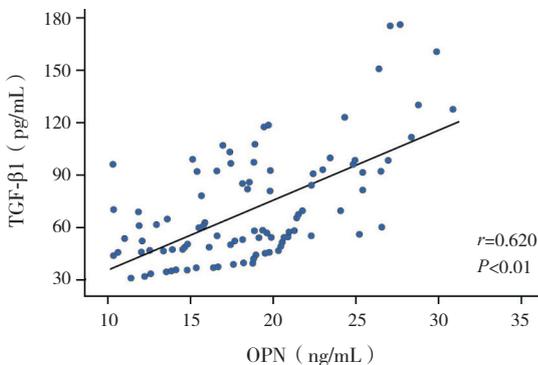


图3 哮喘组血清 OPN 与 TGF-β1 的相关性

3 讨论

流行病学调查显示,哮喘病例中50%以上有过敏史,变应性疾病使哮喘风险增加30%^[6]。研究显示,哮喘儿童伴家族特应质病史者占32.6%^[7],提示变应性疾病为哮喘的危险因素。Moffatt等^[2]发现,ORMDL3基因是一个哮喘相关基因。ORM基因家族编码的蛋白为鞘脂类合成的负调控,基因表达的变化或者突变均可能导致鞘脂代谢紊乱,与儿童哮喘的发生有关^[8]。ORMDL3通过参与细

胞内钙离子信号调控、非折叠蛋白质反应等,参与哮喘的炎症反应调控^[9]。

国内外对ORMDL3基因单核苷酸多态性与哮喘的关系已经进行了多项研究,但由于单个研究的样本量有限、人群不同,导致各研究结果存在一定的差异。Tavendale等^[10]发现苏格兰青少年ORMDL3基因中的SNP rs7216389与哮喘易感性及病情进展相关。崔云霞等^[11]也发现ORMDD基因SNP位点rs7216389多态性与儿童哮喘易感性的相关性。同时研究发现,欧洲人群ORMDL3基因(rs7216389)多态性与儿童哮喘的易感相关性高于亚洲人群^[12]。金哲等^[13]发现ORMDL3基因SNPs的两个位点(rs7216389, rs7216558)与北京地区儿童哮喘无相关性。而Halapi等^[14]则认为,rs7216389位点与哮喘的相关性仅限于发病年龄较早的儿童哮喘,在6~13岁发病者中只观察到微弱相关性,与成人哮喘发作无相关性。本研究发现,湖南省汉族0~5岁儿童ORMDL3基因rs7216389存在单核苷酸多态性,哮喘组与对照组的基因型及等位基因构成比差异无统计学意义,提示该位点单核苷酸多态性可能与湖南省汉族儿童的哮喘易感性无关。本研究与其他类似研究结果不完全相同,不同种族间遗传背景的差异可能是主要原因,也可能与本研究样本量偏小有一定的关系。哮喘是一种多基因遗传病,众多基因相互作用、共同决定其发生发展,因此不同人群中存在的哮喘易感基因也可能不同^[15]。并且,多种环境因素可以影响婴幼儿哮喘的发生,哮喘的发生与不同的环境因素也有关^[16]。

近年来气道重塑被认为是不可逆性气道阻塞和气道高反应性的病理生理基础。本研究针对rs7216389基因位点与血清OPN和TGF-β1水平的关联性进行分析,发现该基因位点不影响OPN、TGF-β1的表达,可能与气道重塑无明显相关性。Kohan等^[17]在小鼠哮喘模型中发现,OPN可诱导巨噬细胞活化以及成纤维细胞分化。另有研究发现哮喘患者的支气管肺泡灌洗液中OPN的含量明显增多,而且与肺泡上皮细胞中OPN的表达呈正相关^[18]。OPN可通过诱导血管内皮生长因子的表达从而促进新血管生成^[19]。TGF-β1可诱导上皮细胞层破坏、杯状细胞增生以及促进血管重构等,促进气道平滑肌的增生、肥大和迁移,引起气道

重塑^[20]。OPN能促进TGF- β 1表达,进而加快组织修复^[21]。

本研究发现哮喘患儿OPN及TGF- β 1的含量均较对照组显著增高;其中哮喘伴特应质组血清TGF- β 1含量明显高于哮喘无特应质组及对照组,哮喘儿童外周血清OPN与TGF- β 1的含量呈直线正相关,提示OPN及TGF- β 1均参与了哮喘的发生及发展过程,且特应质患儿TGF- β 1改变更为显著。同时本研究也发现哮喘组及对照组的三个不同基因型与血清OPN和TGF- β 1含量变化均无相关性,提示ORMDL3基因中rs7216389位点的不同基因型并不影响OPN、TGF- β 1的表达,该基因位点可能与气道重塑无明显相关性。

[参 考 文 献]

- [1] Bai J, Zhao J, Shen KL, et al. Current trends of the prevalence of childhood asthma in three Chinese cities: a multicenter epidemiological survey[J]. *Biomed Environ Sci*, 2010, 23(6): 453-457.
- [2] Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORM DL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 470-473.
- [3] 刘丽红, 郭文才, 周江, 等. ORM DL3 基因 rs7216389 多态性与中国人哮喘易感性的 Meta 分析[J]. *中国循证医学杂志* 2015, 15(2): 170-175.
- [4] Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE, et al. Epithelial stress and structural remodeling in childhood asthma[J]. *Thorax*, 2005, 60(5): 389-394.
- [5] 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和防治指南[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(10): 745-753.
- [6] Tischer C, Chen CM, Heinrich J. Association between domestic mould and mould components, and asthma anti allergy in children: a systematic review[J]. *Eur Respir J*, 2011, 38(4): 812-824.
- [7] Dong GH, Ma YN, Ding H, et al. Pets keeping in home, parental atopy, asthma and asthma-related symptoms in 12,910 elementary school children from Northeast China[J]. *Indoor Air*, 2009, 19(2): 166-173.
- [8] Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1048-1053.
- [9] Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, et al. The asthma-associated ORM DL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(1): 111-121.
- [10] Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay S, et al. A polymorphism controlling ORM DL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(4): 860-863.
- [11] 崔云霞, 张慧妹, 师岩, 等. ORM DL3 基因 SNP 位点 rs7216389 多态性与儿童哮喘易感性关系的荟萃分析[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2012, 46(4): 530-533.
- [12] 李波, 曲书强. ORM DL3/GSDMB 基因多态性与儿童支气管哮喘遗传易感性的 Meta 分析[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2013, 28(22): 1726-1728.
- [13] 金哲, 王金凤, 李红, 等. 北京地区儿童生活方式、免疫状态及 ORM DL3 基因 SNPs 与哮喘发生的相关性研究[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(11): 21-24.
- [14] Halapi E, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, et al. A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma[J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(8): 902-908.
- [15] Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma[J]. *J Pediatr (Rio J)*, 2008, 84(4): s68-s75.
- [16] 蔡迎庆, 徐孝华, 杭杲, 等. 婴幼儿哮喘与环境因素的关系分析[J]. *交通医学*, 2012, 26(6): 584-589.
- [17] Kohan M, Breuer R, Berkman N, et al. Osteopontin induces airway remodeling and lung fibroblast activation in a murine model of asthma[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41(3): 290-296.
- [18] Boulassel MR, Mercier F, Gilmore N, et al. Immunophenotypic patterns of CD8⁺ T cell subsets expressing CD8 α and IL7R α in viremic, aviremic and slow progress or HIV-1-infected subjects[J]. *Clin Immunol*, 2007, 124(2): 149-157.
- [19] Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, et al. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils[J]. *Allergy*, 2010, 65(2): 168-174.
- [20] Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma[J]. *Immunol Cell Biol*, 2007, 85(5): 348-356.
- [21] Singh M, Foster CR, Dalal S, et al. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(3): 538-543.

(本文编辑: 王庆红)