

• 临床研究 •

转化生长因子 β_1 基因多态性及其血清水平与儿童哮喘易感性的关系*张秋兴¹, 李宏彬², 冯宪军³, 桂立辉², 席景砖^{2△}

(1. 河南省平顶山市哮喘病医院呼吸内科 467099; 2. 新乡医学院公共卫生学院, 河南 453003;

3. 新乡医学院第一附属医院呼吸内科, 河南 453003)

摘要:目的 检测转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 基因 C-509T、T869C 位点多态性在哮喘儿童中的分布频率, 并探讨其与哮喘易感性及临床表型的相关性。方法 以 110 例哮喘患儿(哮喘组)和 144 例非哮喘患儿(对照组)为研究对象, 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)技术对 C-509T、T869C 单核苷酸多态性进行基因分型, 同时用 ELISA 法检测血清 TGF- β_1 水平。结果 哮喘组 C-509T 位点 T 等位基因频率显著高于对照组($P=0.006$, $OR=1.66$, 95% $CI: 1.16 \sim 2.37$), 哮喘组 CC 基因型频率低于对照组($P<0.05$), CC 基因型携带者患哮喘病的危险性明显降低($P=0.004$, $OR=0.46$, 95% $CI: 0.27 \sim 0.79$)。TGF- β_1 基因 T869C 位点基因型及等位基因频率在哮喘组和对照组间分布差异均无统计学意义($P>0.05$); 哮喘组患儿血清 TGF- β_1 水平显著高于对照组($P<0.01$), C-509T 位点携带 T 等位基因患儿血清 TGF- β_1 水平高于非携带者($P<0.05$)。结论 TGF- β_1 基因 C-509T 位点 T 等位基因可能是河南儿童哮喘易感基因, T869C 位点多态性可能与儿童哮喘发病无相关性。

关键词: 转化生长因子 β_1 ; 哮喘; 多态性; 单核苷酸; 儿童

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.03.008

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)03-0260-03

Association of transforming growth factor- β_1 genetic polymorphisms with childhood asthma susceptibility and its serum levelsZhang Qiuxing¹, Li Hongbin², Feng Xianjun³, Gui Lihui², Xi Jingzhuang^{2△}

(1. Department of Respiratory Medicine, Asthma Hospital of Pingdingshan City, Henan 467099, China;

2. School of Public Health, Xinxiang Medical University, Henan 453003, China; 3. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To investigate the association of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) gene C-509T and T869C polymorphisms with hereditary susceptibility and clinical phenotype of childhood asthma. **Methods** A total of 144 children without asthma (control group) and 110 asthmatic children (asthmatic group) were recruited for the hospital-based case-control study. Polymorphisms C-509T and T869C were genotyped by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and the serum levels of TGF- β_1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The allele T of C-509T in asthmatic group was significantly higher than that in control group ($P=0.006$, $OR=1.66$, 95% $CI: 1.16 \sim 2.37$). For the SNPs C-509T, CC genotype frequencies in control group were significantly higher than those in asthmatic group ($P<0.05$), and the risk of asthma for the childhood with genotype CC was significantly decreased ($P=0.004$, $OR=0.46$, 95% $CI: 0.27 \sim 0.79$). There were no significant differences for both allele and genotype frequencies of T869C of TGF- β_1 gene between the asthmatic group and control group ($P>0.05$). The serum level of TGF- β_1 was significantly higher in asthmatic patients than that in controls ($P<0.01$) and it was significantly higher in C-509T T allele carriers than non C-509T carriers ($P<0.05$). **Conclusion** T allele of C-509T in TGF- β_1 may be one of the genetic predisposition genes for developing childhood asthma in Henan. TGF- β_1 gene T869C locus genetic polymorphism is weakly associated with childhood asthma.

Key words: transforming growth factor beta1; asthma; polymorphism, single nucleotide; children

支气管哮喘是世界范围内严重威胁公共健康的主要慢性疾病之一,也是儿童日后发展成为成人哮喘及肺心病的潜在危险。在哮喘的发病过程中,转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 不仅参与哮喘气道炎症的形成,也可促进气道平滑肌的增生肥大、迁移,破坏上皮细胞层等多种途径参与气道重塑^[1-3]。分子流行病学研究表明, TGF- β_1 基因存在多个多态性位点参与哮喘的发生,但确切机制尚未明了^[4-5]。本研究应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 TGF- β_1 基因 C-509T、T869C 位点单核苷酸多态性,旨在了解 TGF- β_1 基因多态性及其血清水平与汉族儿童哮喘的发病风险关系,为揭示支气管哮喘的发病机制提供分子生物学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 10 月至 2010 年 12 月在新乡医学院第一附属医院呼吸内科和平顶山市哮喘病医院住院及门诊患儿 110 例为哮喘组,其中男 61 例,女 49 例,年龄 3.1~14.6 岁,所有病例的诊断均符合 2008 年中华医学会儿科学分会呼吸学组修订的儿童支气管哮喘诊断与防治指南中关于儿童支气管哮喘的诊断标准^[6],并将哮喘组患儿分为轻、中度哮喘组(63 例)和重度哮喘组(47 例)。同时分别选择同期入院、性别相同、年龄相近(相差不超过 3 岁)居住地区相同的 144 例非哮喘患儿为对照组,对照均无个人及家族哮喘史和过敏史(包括湿疹、过敏性鼻炎、过敏性皮炎)。所有研究对象均为汉族

* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(200803073)。 作者简介:张秋兴(1971~),副主任医师,本科,主要从事哮喘病分子流行病学的研究。 △ 通讯作者, Tel:13839078788; E-mail: xijz@xxmu.edu.cn。

表 1 各组 TGF-β₁ 基因 C-509T、T869C 位点各基因型及等位基因频率分布[n(%)]

| 组别 | n | TGF-β ₁ (C-509T) | | | | | TGF-β ₁ (T869C) | | | | |
|------|-----|-----------------------------|----------|----------|-----------|------------------------|----------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| | | CC | CT | TT | C | T | TT | CT | CC | T | C |
| 对照组 | 144 | 63(43.8) | 62(43.1) | 19(13.1) | 188(65.3) | 100(34.7) | 51(35.4) | 68(47.2) | 25(17.4) | 170(59.0) | 118(41.0) |
| 哮喘组 | 110 | 29(26.4) | 59(53.6) | 22(20.0) | 117(53.2) | 103(46.8) [#] | 43(39.1) | 53(48.2) | 14(12.7) | 139(63.2) | 81(36.8) |
| 轻中度组 | 63 | 17(27.0) [#] | 34(54.0) | 12(19.0) | 68(54.0) | 58(46.0) [#] | 24(38.1) | 33(52.4) | 6(9.5) | 81(64.3) | 45(35.7) |
| 重度组 | 47 | 12(25.5) [#] | 25(53.2) | 10(21.3) | 49(52.1) | 45(47.9) [#] | 19(40.5) | 20(42.5) | 8(17.0) | 58(61.7) | 36(38.3) |

[#]: $P<0.05$, 与对照组比较。

儿童,所有患儿家长均签署《知情同意书》。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 乙二胺四乙酸二钠(EDTANa₂)抗凝管采集受检者外周经脉血 2 mL 放置 -80 ℃ 冰箱备用。DNA 提取试剂盒购自上海生物工程有限公司,所有操作步骤均按照说明书进行。

1.2.2 基因型检测 通过 GeneBank 查找到 TGF-β₁ 基因编号为 rs1800469 和 rs1982073 完整序列,采用 Primer premier 5 软件设计 C-509T 和 T869C 位点引物,设计的引物由上海生物工程有限公司合成。C-509T 位点上游引物为 5'-CCG CTT CTG TCC TTT CTA GG-3',下游引物为 5'-AAA GCG GGT GAT CCA GAT G-3';T869C 上游引物为 5'-TCC GGG CTG CGG CTG CAG C-3',下游引物为 5'-TCG CGG GTG CTG TTG TAC A-3'。PCR 反应总体积 25 μL,其中 10× Buffer 2.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.7 U, dNTP 2.5 μL, 上下游引物各 1 μL, Template DNA 1.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.8 μL, 双蒸水 14 μL; PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 一定的退火温度 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 ℃ 终延伸 10 min, 最后 4 ℃ 保存。取 10 μL PCR 产物, 建立总体积为 30 μL 的酶切反应体系, 加入相应的限制性酶 *Eco*81 I 和 *Pvu* II (fermentas 基因公司), 37 ℃ 温育 4 h, 65 ℃ 水浴 15 min 终止反应, 酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μg/mL)电泳分离, 经凝胶成像仪系统(BIO-RAD, 美国)处理后进行基因型判读, 记录并保存结果。

1.2.3 血清 TGF-β₁ 水平检测 采集研究对象空腹静脉血 2 mL, 分离血清后置 -20 ℃ 冻存。采用 ELISA 法测定 TGF-β₁ 水平, 检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司, 货号 of SX01073。操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 为考察研究资料的可靠性, 所有位点每组分别进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理, 哮喘组和对照组间基因型频率和等位基因频率的差异性比较行 χ^2 检验, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 样本的 Hardy-Weinberg 平衡检验 两位点在各组的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 表明本次抽样具有代表性。C-509T 位点对照组 ($\chi^2=0.363, P=0.547$), 哮喘组 ($\chi^2=0.405, P=0.524$); T869C 位点对照组 ($\chi^2=0.033, P=0.402$), 哮喘组 ($\chi^2=1.584, P=0.856$)。

2.2 TGF-β₁ 基因多态性位点与儿童哮喘相关性分析 由表 1 可见, 哮喘组 C-509T 位点 T 等位基因频率(46.8%)显著高于对照组(34.7%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$), T 等位基因携带者患哮喘的危险性是 C 等位基因的 1.66 倍(95%CI :

1.78~4.94)。T869C 多态性位点的基因型和等位基因频率在哮喘各组与对照组之间的分布差异无统计学意义 ($P>0.05$)。C-509T 位点 CC 基因型携带者患哮喘的危险性明显低于 CT 和 TT 基因型携带者 ($P=0.004, OR=0.46, 95\%CI: 0.27\sim0.79$), 轻中度和重度哮喘组 CC 基因型频率均低于对照组 ($P<0.05$), 相比较 CC 基因型, 哮喘组 CT 和 TT 基因型频率均高于对照组但差异没有统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组血清 TGF-β₁ 水平 哮喘组患儿血清 TGF-β₁ 水平高于对照组 ($P<0.01$), 且重度哮喘组患儿的 TGF-β₁ 水平显著高于轻中度哮喘组患儿和对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.4 TGF-β₁ 基因多态性对血清 TGF-β₁ 水平影响 携带 C-509T 位点 CT+TT 基因型的患儿 TGF-β₁ 水平明显高于携带 CC 基因型的哮喘患儿 ($P<0.05$)。见表 3。

表 2 各组血清 TGF-β₁ 水平($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

| 组别 | n | TGF-β ₁ |
|------|-----|---------------------------|
| 对照组 | 144 | 17.34±6.04 |
| 哮喘组 | 110 | 36.50±8.72 ^a |
| 轻中度组 | 63 | 29.65±6.91 |
| 重度组 | 47 | 43.21±11.25 ^{ab} |

^a: $P<0.01$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与轻度哮喘组比较。

表 3 TGF-β₁ 基因多态性对血清 TGF-β₁ 水平影响($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

| 项目 | n | TGF-β ₁ |
|-----------|----|--------------------------|
| C-509T 位点 | | |
| CC 基因型 | 29 | 31.22±7.58 |
| CT+TT 基因型 | 81 | 41.63±10.73 ^a |
| T869C 位点 | | |
| TT 基因型 | 43 | 39.25±9.11 |
| CT+CC 基因型 | 67 | 33.64±7.47 |

^a: $P<0.05$, 与 CC 基因型比较。

3 讨 论

关于 TGF-β₁ 基因 C-509T 和 T869C 位点在不同种族对哮喘影响的报道不尽一致。Li 等^[5]在墨西哥哮喘儿童的病例对照研究中, 发现两多态性位点与儿童哮喘的发生存在显著相关性; 而 Wisniewski 等^[7]研究未发现两位点与波兰人哮喘病的发生有关, Acevedo 等^[8]在哥伦比亚人群中实施的病例对照研究中未发现 C-509T 位点多态性与哮喘病发生的相关性, 但其能增强血清特异性 IgE 水平; 中国学者戴红则发现 C-509T 位点 CT 基因型与上海地区儿童哮喘发病明显相关^[9]; 分析原因, 可能不同种族的人群之间的遗传背景不同, 还有样本量、实

验方法及不同的哮喘类型等因素也会对结果造成影响。本研究中入组人群为河南豫北地区人群,基因型分布未偏离 Hardy-Weinberg 平衡,说明人群代表性好。

本组资料结果发现,C-509T 位点 CC 基因型频率在哮喘组的分布明显低于对照组,轻中度和重度哮喘组 CC 基因型频率均低于对照组,提示 CC 基因型可能是哮喘的保护基因型;虽然 CT 和 TT 基因型频率在哮喘组和对照组间差异无统计学意义,但哮喘组 T 等位基因频率显著高于对照组,提示 T 等位基因可能是汉族儿童哮喘的遗传易感基因。T869C 位点基因型和等位基因型频率在哮喘各组和对对照组间的分布无差异,表明该位点的基因多态性对河南汉族儿童哮喘的发生及其严重程度可能没有明显影响。

C-509T 是 TGF- β_1 基因启动子序列中的 SNP 位点,能增强 TGF- β_1 基因的转录,提高血清 TGF- β_1 水平,调节气道炎症和加速气道重塑^[10]。本组资料检测了血清中 TGF- β_1 水平情况,结果显示,哮喘组患儿血清 TGF- β_1 水平高于对照组($P < 0.01$),且重度患者的 TGF- β_1 含量显著高于轻中度患者和对照组($P < 0.05$),这与部分学者的研究结果一致^[11-12]。同时还发现携带 C-509T 位点 CT+TT 基因型的患儿 TGF- β_1 水平明显高于携带 CC 基因型的哮喘患儿($P < 0.05$),进一步表明 TGF- β_1 基因 C-509T 位点 T 等位基因不仅与哮喘病的发生相关,而且影响 TGF- β_1 的表达水平,提示 C-509T 位点 T 等位基因可能是河南地区汉族儿童哮喘的遗传易感基因并影响哮喘的严重程度。尽管本组资料没有发现 T869C 与哮喘的关系,但不排除与其他多态位点的协同作用,下一步将尽可能多地选取哮喘相关基因,对其中的 SNP 位点进行大样本量病例对照研究,为哮喘的风险预测、防治和治疗提供一条新的线索和途径。

参考文献:

- [1] Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF- β in airway remodeling in asthma[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(5): 348-356.
- [2] Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, et al. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(2): 127-133.
- [3] Michaeloudes C, Chang PJ, Petrou M, et al. Transforming

growth factor- β and nuclear factor E-related factor 2 regulate antioxidant responses in airway smooth muscle cells; role in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(8): 894-903.

- [4] Faria IC, Faria EJ, Toro AA, et al. Association of TGF- β_1 , CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents[J]. J Pediatr (Rio J), 2008, 84(3): 203-210.
- [5] Li H, Romieu I, Wu H, et al. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 (TGF- β_1) and childhood asthma and atopy [J]. Hum Genet, 2007, 121(5): 529-538.
- [6] 中华医学会呼吸病学会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177-185.
- [7] Wisniewski A, Obojski A, Pawlik A, et al. Polymorphism of the TGF β 1 gene is not associated with bronchial allergic asthma in a Polish population [J]. Hum Immunol, 2009, 70(2): 134-138.
- [8] Acevedo N, Vergara C, Gusmao L, et al. The C-509T Promoter Polymorphism of the Transforming Growth Factor Beta-1 Gene is Associated with Levels of Total and Specific IgE in a Colombian Population [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2010, 151(3): 237-246.
- [9] 戴红, 刘全华, 华丽, 等. 上海地区儿童哮喘与单核苷酸多态性关系研究[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(11): 1039-1042, 1046.
- [10] Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, et al. TGF- β 1 promoter polymorphism C-509T and pathophysiology of asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(3): 659-664.
- [11] Mak JC, Leung HC, Ho SP, et al. Analysis of TGF- β 1 gene polymorphisms in Hong kong Chinese patient s with asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(1): 92-96.
- [12] Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, et al. TGF- β 1 promoter polymorphism C-509T and pathophysiology of asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(3): 659-664.

(收稿日期: 2012-09-19 修回日期: 2012-11-08)

(上接第 259 页)

- 性与健康教育[J]. 中国健康教育, 2003, 19(6): 438.
- [5] 韩雅君, 王伟民. 冠状动脉支架内血栓形成[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2005, 7(5): 351-352.
- [6] 林松. 强化冠状动脉支架置入术后药物依从性的管理[J]. 中国医学文摘: 内科学, 2006, 27(5): 442-443.
- [7] Clouston KM, Katz A, Martens PJ, et al. Does access to a colorectal cancer screening website and/or a nurse-managed telephone help line provided to patients by their family physician increase fecal occult blood test uptake? A pragmatic cluster randomized controlled trial study proto-

col[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 182.

- [8] 苏带兰, 李慧敏, 韦晓静, 等. 冠心病介入治疗患者采用多媒体实施健康教育的效果研究[J]. 护理实践与研究, 2009, 6(8): 8-10.
- [9] 朱莉, 郑春梅. 健康教育处方在老年内科优质护理示范病房中的应用[J]. 重庆医学, 2012, 41(24): 2556-2558.
- [10] 张立颖, 李亚洁, 吴丽萍, 等. 14 所医院腹部手术患者健康需求方式调查[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(6): 1294-1296, 1299.

(收稿日期: 2012-10-21 修回日期: 2012-12-16)