

HLA-G 基因 3' 端单核苷酸多态性与广西儿童哮喘的相关性研究

甄 宏, 谢庆玲, 唐晓燕, 洪 梅, 温志红, 谭 颖

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科青 0728037); 广西卫生厅科研课题(编号:Z2009167)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院儿科

作者简介: 甄 宏(1973-), 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 呼吸系统疾病。E-mail: zhenhongzh@163.com

[摘要] **目的** 探讨 HLA-G 基因 3' 端单核苷酸多态性与广西儿童哮喘发病的关联性。**方法** 采用基于基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱技术检测广西儿童支气管哮喘患者 84 例及正常对照儿童 116 例的 HLA-G 基因 3' 端单核苷酸多态性(rs1704 和 rs1063320)分型变化, 并与 HLA-DR 基因型进行多元回归分析, 寻找易感基因型及单体型。**结果** rs1063320 基因型构成比在哮喘组和对照组差异有统计学意义($P < 0.05$); rs1704 和 rs1063320 位点的 14 bp 缺失-G 单体型能明显降低儿童哮喘的发病风险; 14 bp 缺失-G-HLA-DRB1 * 15XX 单体型是儿童哮喘的保护性单体型, 能更明显降低哮喘的发病风险, 并使哮喘病人的血清 IgE 水平降低($P < 0.05$)。**结论** HLA-G 基因的 3' 单核苷酸多态性与广西儿童哮喘的发病相关。rs1704 和 rs1063320 位点的 14 bp 缺失-G 单体型是儿童哮喘的保护性单体型。

[关键词] HLA-G; 多态性; 单核苷酸; 哮喘

[中图分类号] R 725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)12-1105-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.12.01

Association of HLA-G 3' untranslated regions polymorphism with children asthma ZHEN Hong, XIE Qing-ling, TANG Xiao-yan, et al. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between single nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated regions of HLA-G gene and asthma occurrence of children. **Methods** Totally 84 children cases with asthma and 116 controls in Guangxi region were included into the study. The HLA-G gene single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping, rs1704 and rs1063320, was performed by using MassARRAY system (Sequenom) by means of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry method (MALDI-TOF). And multiple regression analysis was performed to explore the asthma correlation. **Results** There was significant difference in the distribution of the genotypes of rs1063320 between cases and controls ($P < 0.05$). The individuals with rs1704/rs1063320 14-bp deletion/G haplotype had decreased risk of asthma (odds ratio [$\hat{OR}$] = 0.344, 95% confidence interval [$95\% CI$] = 0.149 ~ 0.799, $P < 0.05$), and the association with asthma of rs1704/rs1063320 14-bp deletion/G combined HLA-DRB1 * 15XX haplotype was more apparent with OR value of 0.198, 95% CI of 0.084 ~ 0.471 ($P < 0.001$), and with lower serum value of IgE in asthma cases ($P < 0.05$). **Conclusion** HLA-G 3' UTR SNPs has correlations with etiology of asthma. Having the haplotype of rs1704/rs1063320 14-bp deletion/G are protective from children asthma.

[Key words] HLA-G gene; Polymorphism; Single nucleotide; Asthma

支气管哮喘是一种多发的慢性呼吸道炎症性疾病, 变应性体质和家族遗传的基因特征是其重要易感因素, 因此, 被认为是一种多基因遗传性疾病^[1]。

有报道显示 HLA-G 基因与哮喘发病相关, 而 HLA-G 基因 3' 端非编码区的单核苷酸多态性对 HLA-G 基因发挥了重要的表达调控作用^[2]。我们对广西儿

童人群 HLA-G 基因 3' 端非编码区的单核苷酸多态性进行了研究,探讨其与儿童哮喘易感性的关系,报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 选儿童支气管哮喘患者(研究组)84例,男49例,女35例;汉族57例,壮族27例;年龄6~14岁,平均为9.4岁,均为广西人(广西籍且居住广西);临床诊断符合儿童支气管哮喘标准^[3],同时排除慢性咳嗽、慢性消耗性疾病及合并心肝肾、内分泌、免疫系统疾病和肿瘤患者。对照组为广西地区116名无血缘关系的健康体检儿童,其中男66名,女50名;汉族79名,壮族37名;年龄为6~14岁;无自身和家族特异性病史,无心肝肾、内分泌、免疫系统疾病和肿瘤者。哮喘组和正常对照组间性别($\chi^2=0.001, P=0.971$)和民族分布($\chi^2=0.473, P=0.492$)及年龄方面差异无统计学意义,具有可比性。经免疫发光法测定血清总 IgE 水平,哮喘组明显高于对照组。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 收集受检者外周血,采用基因组提取试剂盒(美国 Promega 公司的 Wizard Genomic DNA Purification Kit),按说明书操作提取基因组 DNA,通过 DNA 样本纯度的质量检测后-20℃保存。

1.2.2 HLA-G 基因多态性分析 由上海邃志生物科技有限公司利用美国 Sequenom 公司的 MassARRAY 系统采用基于基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱技术(MALDI-TOF)完成。检测 HLA-G rs1063320 位点的 C/G 和 rs1704 的 14 bp 插入/缺失基因型。引物序列:rs1063320d 的 PCR 引物 Forward 为 ACGTTGGATGTACAGAAGTAAGTTATAGC;Reverse 为 ACGTTGGATGCCAATCACCTTTCTGTTCC,单碱基延伸引物 TCTGTCTCAAATTTGTGCT。rs1704 的 PCR 引物 Forward 为 ACGTTGGATGACAAAGAG-GAGTCAGGGTTC;Reverse 为 ACGTTGGATGTGTAG-TGTGAAACAGCTGCC,单碱基延伸引物 TGGGACT-GAGTGGCAAG。

1.2.3 HLA-DR 基因分型检测 由上海博星基因芯片有限公司采用基因芯片方法检测^[4]。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行统计学处理,计数资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验,相关因素采用 Logistic 回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

万方数据

2 结果

2.1 儿童哮喘发病的关联性分析 HLA-G rs1063320 的 G 基因型频率哮喘组为 37.5%,对照组为 48.3%,两组比较差异有统计学意义($\chi^2=4.065, P=0.044$);而 rs1704 的 14 bp 缺失基因型频率哮喘组为 79.01%,对照组为 82.61%,两组间差异无统计学意义($\chi^2=0.048, P=0.827$)。在 HLA-DRB1 的 14 种基因型中发现 HLA-DRB1 * 15XX 在哮喘组的出现频率为 16.97%,在对照组的出现频率为 33.18%,两组之间比较差异有统计学意义($\chi^2=7.555, P=0.006$)。

2.2 单体型与儿童哮喘发病的关联性分析 rs1704 和 rs1063320 位点表现有 4 种单体型(见表 1),单体型频率分布在哮喘组与正常组间差异有统计学意义($\chi^2=13.166, P=0.004$)。

表 1 rs1704 和 rs1063320 单体型在哮喘组和正常组中的频率分布(%)

组别	14 bp 缺失-G	14 bp 缺失-C	14 bp 插入-G	14 bp 插入-C
哮喘组	34.62	45.51	2.56	17.31
正常组	47.37	35.53	0.00	17.11

2.3 多元回归分析 分析结果显示,rs1704 和 rs1063320 位点的 14 bp 缺失-G 单体型与 HLA-DRB1 * 15XX 均能降低儿童哮喘发病风险,两者共同发挥作用(见表 2)。从而构建了 HLA-G rs1704 和 rs1063320 位点及 HLA-DRB1 的一个单体型,即 14 bp 缺失-G-HLA-DRB1 * 15XX 单体型。该单体型携带者与未携带者相比,哮喘风险明显降低(校正 $\hat{OR}=0.198$,其 95% CI 为 0.084~0.471, Wald $\chi^2=13.419, P<0.001$);哮喘组中携带该单体型者血清 IgE 水平也较低,为 (365.0 ± 943.1) kU/L,与未携带该单体型的哮喘患者 $[(977.8 \pm 14334.9)$ kU/L] 相比,差异有统计学意义($F=4.827, P=0.031$)。

表 2 rs1704 和 rs1063320 单体型及 HLA-DRB1 基因型与哮喘发病的多元回归分析结果

型别	b	Wald χ^2	P	校正 $\hat{OR}$	$\hat{OR}$ 95% CI
14 bp 缺失-G 单体型	1.066	6.173	0.013	0.344	0.149~0.799
HLA-DRB1 * 15XX	0.864	7.226	0.007	0.421	0.224~0.791

3 讨论

3.1 儿童哮喘被认为是一种多基因遗传性疾病,在众多影响炎症反应调控的遗传因素研究中,国外学者^[2]通过分析哮喘相关的微卫星和单核苷酸多态性等遗传学标志,发现了 HLA-G 基因与哮喘发病密切相关,并将 HLA-G 基因称为哮喘基因。HLA-G

基因位于 6 号染色体短臂(6p21.3)HLA 基因复合体内,所编码的 HLA-G 分子被证明具有重要的免疫负调控功能^[5]。有研究^[6]发现在哮喘患者中外周血单个核细胞 HLA-G 的表达分泌明显降低,而在哮喘病人的气道上皮细胞检测到的 HLA-G5 分子(为可溶性分子)水平却比正常人更高^[2,7]。说明 HLA-G 的多种异构体(包括可溶性分子和膜蛋白)在哮喘中可能扮演着复杂而不同的作用。

3.2 本研究采用基于基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱技术分析了 HLA-G 3' 非编码区两个重要 SNP 位点(rs1704 和 rs1063320)的多态性。这两个位点均能与微小 RNA(microRNAs, miRNA)结合,其与 HLA-G 基因的 mRNA 调控有关^[8]。通过对广西 84 例哮喘儿童和 116 名健康儿童对照的研究,发现 rs1063320 位点与儿童哮喘发病相关;虽然单独分析 rs1704 位点未能发现与哮喘的关联性,但其与 rs1063320 构建的 14 bp 缺失-G 单体型却能明显降低儿童哮喘发病风险。文献报告在美国芝加哥人群中 also 发现 rs1063320 G 为哮喘的保护性基因型^[9],并且实验研究发现 rs1063320 G 有利于与 miR-148a 和 miR-148b 等结合,可降低细胞产生可溶性 HLA-G 分子^[8]。本研究发现 rs1704 和 rs1063320 的 14 bp 缺失-G 单体型是哮喘的保护性基因型,有助于提供 HLA-G 基因与哮喘发病机制研究的线索。

3.3 有研究发现 HLA-DR 基因也与哮喘发病相关^[4],在本研究中也发现了 HLA-DRB1 * 15XX 对儿童哮喘发病的保护作用,HLA-DRB1 * 15XX 与 HLA-Grs1704 和 rs1063320 的 14 bp 缺失-G 构成的 14 bp 缺失-G-HLA-DRB1 * 15XX 单体型更能明显降

低哮喘的发生风险;并且在哮喘病儿中血清 IgE 水平也较低。这一基因型与表型的关联性为开展哮喘的免疫遗传学研究提供了现实依据,为临床早期鉴定哮喘易感儿提供了帮助。

参考文献

- 1 张建华. 支气管哮喘的流行病学及高危因素[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(4):241-243.
- 2 Ober C. HLA-G; An asthma gene on chromosome 6p [J]. Immunol Allergy Clin North Am,2005, 25(4):669-679.
- 3 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[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10):745-753.
- 4 谢庆玲, 秦 岭, 焦 伟, 等. 广西壮、汉族哮喘儿童人类白细胞抗原-B、DR 基因的多态性[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(4): 253-256.
- 5 Carosella ED, Gregori S, Rouas-Freiss N, et al. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis[J]. Cell Mol Life Sci,2011,68(3): 353-368.
- 6 Rizzo R, Mapp CE, Melchiorri L, et al. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(3):508-513.
- 7 White SR, Loisel DA, McConville JF, et al. Levels of soluble human leukocyte antigen-G are increased in asthmatic airways[J]. Eur Respir J,2010,35(4):925-927.
- 8 Castelli EC, Moreau P, Oyae Chiromatzo A, et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes[J]. Hum Immunol,2009,70(12): 1020-1025.
- 9 Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, et al. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression[J]. Hum Immunol. 2006, 67(1-2):53-62.

[收稿日期 2011-07-21][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、出生年月、性别、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4 纸打印稿一份,并发电邮到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

· 本刊编辑部 ·