

人类白细胞抗原-DR 及-G 基因多态性与广西儿童哮喘发病的研究

谢庆玲, 甄 宏, 秦 岭, 唐晓燕, 谭 颖, 廖婷婷, 王 敏, 贺海兰

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2012273)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院儿科(谢庆玲, 甄 宏, 唐晓燕, 谭 颖, 廖婷婷, 王 敏, 贺海兰), 认知睡眠中心(秦岭)

作者简介: 谢庆玲(1961-), 女, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 儿童呼吸系统疾病的诊治。E-mail: qinglingxie@yahoo.com.cn

[摘要] **目的** 探讨人类白细胞抗原(HLA)-DR 及-G 基因多态性与儿童哮喘的关系。**方法** 以无血缘关系的 84 例哮喘儿童为哮喘组, 168 名无哮喘和特应性疾病的健康个体为对照组。采用 Pharmacia UniCAP 系统检测哮喘儿童的血清总 IgE 水平。应用基因芯片法检测 HLA-DR 的 21 个基因位点和基于基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱技术(MALDI-TOF)检测 HLA-G 的 9 个单核苷酸位点。**结果** (1) 儿童哮喘组 HLA-DRB1*070X 基因和 HLA-DRB1*11XX 基因频率分别为 2.98% 和 13.69%, 对照组分别为 0.3% 和 5.95% ($\chi^2 = 6.915, P < 0.05$; $\chi^2 = 9.478, P < 0.01$)。优势比($\hat{OR}$)分别为 10.57(95% CI : 1.215 ~ 91.986)和 2.79(95% CI : 1.429 ~ 5.449)。HLA-DRB3(52)*010X 基因频率在哮喘组为 7.14%, 低于对照组的 13.99% ($\chi^2 = 5.854, P < 0.05$), $\hat{OR}$ 为 0.429(95% CI : 0.214 ~ 0.862)。(2) HLA-DRB1*15XX-HLA-G 的 rs1704 和 rs1063320 位点的 14 bp 缺失-G 单体型(HLA-DRB1*15XX-14bp 缺失-G)携带者哮喘风险比未携带者降低(Wald 值为 13.419, $P < 0.001$), $\hat{OR}$ 值为 0.198, 95% CI 为 0.084 ~ 0.471; 哮喘组中携带该单体型者血清 IgE 水平(365.0 ± 943.1) KU/L, 也较未携带者(977.8 ± 14334.9) KU/L 为低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HLA-DRB1*070X 基因和 HLA-DRB1*11XX 基因与儿童哮喘易感性相关, HLA-DRB3(52)*010X 基因可能为保护性基因, HLA-DRB1*15XX 和 HLA-G 的 rs1704 和 rs1063320 位点的 14 bp 缺失-G 单体型是哮喘的保护性单体型。

[关键词] 哮喘; 人类白细胞抗原(HLA); 基因多态性; 儿童

[中图分类号] R 725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)02-0109-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.02.05

Study on the association between Human Leukocyte antigen gene-DR and -G polymorphisms and children asthma in Guangxi XIE Qing-ling, ZHEN Hong, QIN Lin, et al. Department of Pediatrics, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the association between Human Leukocyte antigen DR(HLA-DR) gene polymorphisms and asthma in children. **Methods** Eighty-four unrelated asthmatic children and one hundred and sixty-eight healthy controls without asthma and atopy were involved in the study. All asthmatics had their serum total IgE levels measured with UniCAP Pharmacia system were taken among the asthmatic children. HLA oligonucleotide array was used to detect twenty-one gene frequencies of HLA-DR, and massARRAY system (Sequenom) by means of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry method(MALDI-TOF) for HLA-G gene single nucleotide poly -morphism (SNP) genotyping. **Results** (1) The frequencies of HLA-DRB1*070X allele and HLA-DRB1*11XX allele in the asthmatic children were 2.98% and 13.69%, significantly higher than those in healthy controls (0.3% and 5.95%, $\chi^2 = 6.915, P < 0.05$; $\chi^2 = 9.478, P < 0.01$), Odds ratios (Ors) were 10.57(95% CI : 1.215 ~ 91.986) and 2.79(95% CI : 1.429 ~ 5.449) respectively. HLA-DRB3(52)*010X allele were significantly decreased in asthmatics compared to healthy controls (13.99%, $\chi^2 = 5.854, P < 0.05$), Ors were 0.429(95% CI : 0.214 ~ 0.862). (2) The individuals with HLA-DRB1*15XX-rs1704/rs 1063320 locus and 14-bp deletion/G

haplotype was lower asthmatics risk than those without the same haplotype, and Ors was 0.198 (95% CI: 0.084 ~ 0.471), also the level of serum value of IgE in asthmatic children were significantly lower than those without the haplotype of rs1704/rs1063320 14-bp deletion/G ($P < 0.05$). **Conclusion** HLA-DRB1*070X allele and HLA-DRB1*11XX allele were implicated in susceptibility to asthma, HLA-DRB3(52)*010X allele might confer protection against asthma. And the haplotype of HLA-DRB1*15XX- rs1704/rs1063320 14-bp deletion/G are protective from children asthma.

[**Key words**] Asthma; Human leukocyte antigen(HLA); Gene polymorphism; Children

支气管哮喘是常见的呼吸道慢性炎症性疾病,患病率呈逐年增加趋势,哮喘患儿常有特应性体质。人类白细胞抗原(HLA)在抗原加工提呈和调节免疫应答的关键作用中具有影响机体免疫反应的特异性。我们对哮喘儿童的 HLA-DR、-G 的基因多态性进行了研究,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 儿童哮喘组选择 2011-01 ~ 2011-12 儿童哮喘专科门诊随访的长期居住广西南宁地区 5 ~ 14 岁无血缘关系的哮喘儿童 84 例,其中男 49 例,女 35 例,年龄 6 ~ 14 (9.4 ± 3.2) 岁。诊断和分期符合全国儿童哮喘防治协作组制定的标准^[1]。所有研究对象均在 3 岁以前发病,哮喘病程 3 ~ 12 年。所有哮喘儿童均有至少 1 种变应原阳性,排除慢性咳嗽、慢性消耗性疾病以及合并心、肝、肾、内分泌、免疫系统疾病和肿瘤者。正常对照组选择广西籍无血缘关系居住在广西的正常儿童 48 名和成年人 120 名,既往和当前无哮喘和特异性病史,无免疫系统疾病和肿瘤,2 周内无抗过敏药、激素等用药史。

1.2 研究方法

1.2.1 背景资料采集 (1)对确定的研究对象进行个人史、发育史、疾病情况及家族成员特异性(哮喘、变应性鼻炎、湿疹)发病情况及治疗效果的采集。(2)对研究对象行变应原皮肤点刺试验(共 10 种吸入性变应原包括粉尘螨、户尘螨、蟑螂、狗毛、猫毛、家鼠、羽毛、真菌、香烟和棕榈花粉)。(3)分别对哮喘患儿及正常对照组分别每人采集外周血 20 ml,提取淋巴细胞于液氮中保存,测定血清总 IgE 水平。

1.2.2 检测方法 (1)HLA-DR 位点基因测定采用 HLA 基因芯片方法检测 HLA-DR 的 21 个基因位点。(2)HLA-G 基因利用美国 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)检测。

1.3 统计学方法 应用 SPSS14.0 软件进行统计学处理。用直接记数法计算各组 HLA-DR 位点的等位基因频率。两组间基因频率的比较采用 χ^2 检验。

基因频率在组间有差异的基因认为是关联基因。采用多因素 Logistic 回归分析查找 HLA-DR 与 HLA-G 基因与哮喘发病的相关单体型。进一步计算各个基因型、单体型与哮喘的关联强度-比值比(OR 值)及其 95% 可信区间(95% CI)。

2 结果

2.1 血清总 IgE 水平 哮喘组中有 74 例测定了血清总 IgE 水平,最低者 3.55 KU/L,最高者超过 5 000 KU/L,平均为(596.58 ± 959.87)KU/L,超过 50 KU/L 者 48 例,其中超过 100 KU/L 者 45 例,超过 1 000 KU/L 者 15 例。

2.2 HLA-DR 基因型 共检测出 21 个 HLA-DR 等位基因。哮喘组儿童与正常对照组有 3 种 HLA-DR 等位基因的基因频率有明显差异。HLA-DR B1*070X 在哮喘组中的基因频率为 2.98%,在正常对照组中为 0.3% ($\chi^2 = 6.915, P < 0.05$), OR 值为 10.57 (95% CI: 1.215 ~ 91.986); HLA-DRB1*11XX 在哮喘组中的基因频率为 13.69%,在正常对照组为 5.95% ($\chi^2 = 9.478, P < 0.01$), OR 为 2.79 (95% CI: 1.429 ~ 5.449); HLA-DRB3(52)*010X 在哮喘组中的基因频率为 7.14%,在正常对照组中为 13.99% ($\chi^2 = 5.854, P < 0.05$), OR 为 0.429 (95% CI: 0.214 ~ 0.862)。

2.3 HLA-GSNP 基因型与哮喘相关性分析 rs1704 和 rs1063320 位点 2 个位点的基因型在哮喘组和对对照组差异有统计学意义,14bp-G 在哮喘组出现的频率为 34.62%,对照组为 47.37% ($\chi^2 = 6.173, P < 0.05$)。对上述 HLA-G 和 HLA-DR 的分型结果及哮喘发病与否进行 Logistic 多元回归分析,使用的引进判别标准为 $P \leq 0.05$,剔除判别标准为 $P \geq 0.10$ 。得到回归方程 $y = -0.584 + 0.46114\text{bp 缺失-G} + 0.928\text{HLA-DRB1*15XX}$ (HLA-G 14bp 缺失-G 的 Wald 值 = 4.910, $P < 0.05$; HLA-DRB1*15XX 的 Wald = 12.597, $P < 0.01$)。哮喘组 HLA-DRB1*15XX-14bp 缺失-G 单体型携带者与未携带者相比低(Wald 值为 13.419, $P < 0.001$), OR 值为 0.198,

95% *CI* 为 0.084 ~ 0.471;哮喘组中携带该单体型者血清 IgE 水平 (365.0 ± 943.1) KU/L,与未携带者 (977.8 ± 14334.9) KU/L 比较,差异有统计学意义 ($F=4.827, P=0.031$)。

3 讨论

3.1 哮喘是由免疫遗传和环境因素等共同作用所引起的临床综合征,以慢性气道变应性炎症及气道高反应为本质,在遗传学上呈现为多基因遗传模式,发病机制复杂,许多遗传因素影响炎症反应的调控。Dausset 于 1958 年首次描述了白细胞抗原,随后国际上大量深入的研究证明,HLA 是目前已知的人类最具多态性、最复杂的遗传系统。HLA 为第 6 条染色体短臂上分布的一组紧密连锁的基因群,全长约 3 600 kb,经测序确认了 224 个基因座。由于 HLA 基因具有高度多态性,它可作为一种较好的遗传标记,用于有遗传倾向疾病的关联研究。HLA 与哮喘的相关性研究始于 20 世纪 80 年代。人们经过不断研究,分析哮喘与 HLA 的遗传易感性,直至现在,研究人员对这一课题仍然热情不减^[2,3]。最近基因组范围相关性研究方法 (GWAS) 的结果重新验证了 HLA-DR 基因多态性与哮喘发病的关联性^[3]。HLA 决定了对抗原起反应的辅助 T 淋巴细胞基因,在抗原加工提呈和调节免疫应答过程中起关键作用,从而影响免疫反应的特异性。HLA II 类基因中以 DRB1 最具多态性,它包括 160 个以上的等位基因,对于免疫应答起着决定性作用。我们的研究表明广西哮喘儿童 HLA-DR 等位基因遗传易感性呈现一定特点^[4,5]。本资料显示 HLA-DRB1*070X、DRB1*11XX 和 DRB3(52)*010X 等位基因与哮喘的发病相关,带有 HLA-DRB1*070X 等位基因的患哮喘的危险高达 10.57 倍,带有 HLA-DRB1*11XX 等位基因的人群患哮喘的危险度是未带有该基因的 2.79 倍;而带有 HLA-DRB3(52)*010X 等位基因的人群哮喘发病的危险度比未带有该基因的降低了 50% 左右。

3.2 HLA-G 基因是新近发现的组织相容性复合体分子,直接参与自身免疫和炎症性疾病的发生发展^[6]。HLA-G 基因位于 6 号染色体短臂上的 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^[7],并且影响 Th1/Th2 平衡^[8]。有研究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^[9],而在哮喘患者的气道上皮细胞检测到的 HLA-G5 可溶性分子水平却

比正常人更高^[10]。提示 HLA-G 的免疫调控功能与哮喘发病有一定的相关。我们的研究结果提示 HLA-DRB1*15XX 基因型和 HLA-G 的基因共同作用对儿童哮喘发病产生保护。对 HLA-G rs1704 和 rs1063320 位点和 HLA-DRB1 的分型结果分析显示 HLA-DRB1*15XX 与 HLA-G 的 rs1704 和 rs1063320 位点的 14bp 缺失-G 单体型均能降低儿童哮喘发病风险,共同发挥作用,从而构建了 HLA-DRB1 和 HLA-G rs1704 及 rs1063320 位点的一个单体型,即 HLA-DRB1*15XX-14bp 缺失-G 单体型。该单体型携带者与未携带者相比,哮喘风险幅度降低;哮喘组中携带该单体型者血清 IgE 水平也较低。

本研究结果发现了广西地区人群的哮喘儿童易感基因,将可以用于临床早期筛选哮喘患者,也有助于从遗传角度深入探索哮喘的发病机理。

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[J]. 中华儿科杂志,2008,46(10):743-754.
- 2 Martyn MB, Molis W, Jacobson RM, et al. Human leukocyte antigen type and progression from onset of symptoms to development of asthma[J]. Allergy Asthma Proc,2010,31(2):120-125.
- 3 Li X, Howard TD, Zheng SL, et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions[J]. J Allergy Clin Immunol,2010,125(2):328-335. e11.
- 4 谢庆玲,秦 岭,焦 伟,等. 广西支气管哮喘儿童 HLA 等位基因的研究[J]. 广西医学,2007,29(12):1843-1846.
- 5 谢庆玲,秦 岭,焦 伟,等. 广西地区哮喘儿童人类白细胞抗原-DR 位点等位基因研究[J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(21):1610-1611.
- 6 Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, et al. HLA-G: from biology to clinical benefits[J]. Trends Immunol, 2008, 29(3):125-132.
- 7 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.
- 8 Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokine balance in favor of Th2 versus Th1/Th17[J]. Blood, 2011, 117(26):7021-7031.
- 9 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.
- 10 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.

[收稿日期 2012-08-27][本文编辑 杨光和 韦所苏]