

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00481

## IL-17 基因启动子区单核苷酸多态性与儿童哮喘的关系

王娟, 周娟, 蔺丽慧, 李佳, 彭霞, 李莉\*

上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院检验科, 上海 200080

**[摘要]** **目的** 探讨 IL-17 基因启动子区单核苷酸多态性(SNP)与儿童哮喘及患儿血清总 IgE 水平之间的关系。**方法** 提取 287 例哮喘患儿和 217 例健康儿童外周血基因组 DNA, 采用 PCR-LDR 技术检测了 IL-17 基因启动子区的 4 个 SNPs 位点(rs4711998、rs8193036、rs3819024 和 rs2275913), 与 GenBank 公布的 IL-17 基因序列(NT\_007952.15 GI:224514668)比较, 分析其在两组儿童中的基因型及等位基因频率的分布, 以及哮喘患儿血清总 IgE 水平及其在不同基因型中的差异。**结果** 两组 rs4711998 位点基因型分布差异有统计学意义( $P=0.03$ ), 哮喘组 GG 纯合子基因频率为 9.6%, 明显高于健康对照儿童组(4.1%); rs8193036、rs3819024、rs2275913 三个 SNP 位点的基因型分布在两组间差异无统计学意义。哮喘组血清总 IgE 水平在 4 个 SNP 位点基因型间的分布差异均无统计学意义。**结论** IL-17 基因启动子区 SNP rs4711998 可能是儿童哮喘易感位点, 其中 rs4711998 GG 纯合子基因型与哮喘发病密切相关。

**[关键词]** 白介素 17; 单核苷酸多态性; 免疫球蛋白 E; 哮喘

**[中图分类号]** R 725.622.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0481-04

### Association of single nucleotide polymorphism of IL-17 gene promoter with childhood asthma

WANG Juan, ZHOU Juan, LIN Li-hui, LI Jia, PENG Xia, LI Li\*

Department of Laboratory Diagnosis, First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the association of IL-17 gene promoter single nucleotide polymorphism(SNP) with childhood asthma and total serum IgE level in children. **Methods** The genomic DNA was extracted from the peripheral blood of 287 asthmatic children and 217 healthy children. Four SNPs (rs4711998, rs8193036, rs3819024 and rs2275913) in the IL-17 gene promoter were detected by PCR-LDR (polymerase chain reaction-ligation detection reaction), and the results were compared with those in GenBank (IL-17, NT\_007952.15 GI: 224514668). The genotype and allele frequencies were analyzed in asthmatic children with different total serum IgE levels. **Results** Notable diversity was found in SNP rs4711998 between the asthmatic and control groups ( $P=0.03$ ), with the frequency of genotype GG in the asthmatic group being significantly higher than that in the control group (9.6% vs 4.1%). There was no significant diversity in other three SNPs (rs8193036, rs3819024 and rs2275913) between the two groups. The four SNP genotypes were not associated with the total serum IgE levels in asthma patients. **Conclusion** The SNP rs4711998 may be a susceptibility gene for asthma in children, and rs4711998 GG genotype is closely associated with childhood asthma.

**[Key words]** interleukin-17; single nucleotide polymorphism; immunoglobulin E; asthma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5):481-484]

过敏性哮喘是一种以呼吸道高反应性和慢性过敏性炎症为主要特征并反复发作的呼吸道常见病<sup>[1]</sup>。Th 细胞在过敏性哮喘中发挥着重要的免疫调节作用, Th2 占优势的 Th1/Th2 失衡是过敏性哮喘发病的一个重要机制。近年来发现 Th17 细胞及

IL-17 也与过敏性哮喘密切相关, 研究认为 IL-17 可能通过多种机制调节哮喘患者的肺部炎症和全身免疫反应<sup>[2]</sup>。IL-17 基因定位于人类染色体 6p12.1<sup>[3]</sup>, 其单核苷酸多态性(SNP)位点多位于非编码区, 其中位于基因启动子区域的 SNP 位点可能引起基因转录

**[收稿日期]** 2011-03-16 **[接受日期]** 2011-05-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30972824, 81072448), 上海市科委长三角科技联合攻关项目(10495810200)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30972824, 81072448) and the Yangze River Delta Joint Projects of Science and Technology Committee of Shanghai (10495810200)。

**[作者简介]** 王娟, 硕士生, E-mail: wjuan920@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-63240090-4306, E-mail: annylish@hotmail.com

活性改变,造成该基因的表达变化,最终导致机体的反应差异,具有重要的生物学意义。但国内对于 IL-17 基因多态性与过敏性哮喘的相关性研究鲜见报道。本研究旨在通过分析 IL-17 基因启动子区中 4 个 SNP 位点在哮喘患儿与健康儿童的差异,探讨 IL-17 基因启动子区 SNP 与儿童哮喘及其血清总 IgE 水平之间的关系,以期寻找过敏性疾病的易感基因。

### 1 对象和方法

1.1 研究对象 哮喘患儿共 287 例,来自上海市新华医院儿科哮喘专家门诊和上海市儿童医院,其中男 171 例,女 116 例,年龄 1~12 岁,平均(4±3)岁。诊断符合 2006 年全球哮喘防治倡议委员会(The Global Initiative for Asthma,GINA)修订的儿童哮喘诊断标准。健康儿童对照组来自上海市儿童医学中心,共 217 例,其中男 119 例,女 98 例,年龄 1~12 岁,平均(8±2)岁,经问卷调查明确患儿及直系亲属中无哮喘或其他反复发作的过敏性疾病史。患儿和监护人均知情同意,并签署知情同意书。采集外周静脉血液标本,收集血清,-20℃冻存,分别用于提取 DNA 和 IgE 检测。

1.2 SNP 位点的选择 根据 SeattleSNPs 网站(<http://pga.mbt.washington.edu/education.html>)已报道的中国人 IL-17 基因 SNP 位点,共有 11 个候选 SNP 位点,其中 4 个 SNP 位点(rs4711998、rs8193036、rs3819024 和 rs2275913)位于 IL-17 启动子区,位置分别为-832、-692、-399、-152(以 IL-17 mRNA 起始位置为 0),选取这 4 个 SNP 位点进行基因分型。

1.3 引物设计 根据 GenBank 公布的 IL-17 基因序列设计 IL-17 启动子区 PCR 引物各一对。序列为:rs4711998 上游引物 5'-CCC CCG AGT TAG CAT GTA GA-3',下游引物 5'-CAT GAT GGG GGA AAG AGA GA-3';rs8193036 上游引物 5'-CCT TCT CTC TTT CCC CCA TC-3',下游引物 5'-TGT TAA AGG CAT GTT CCA ACC-3';rs3819024 上游引物 5'-TGA GCA GAG TAG ATA TTC AAC AAA A-3',下游引物 5'-TTT AAT GGT TCA TGA GGA AGA AA-3';rs2275913 上游引物 5'-GCA GCT CTG CTC AGC TTC TAA-3',下游引物 5'-GGG CTT TTC TCC TTC TGT GG-3'。多重 PCR 引物和 LDR 探针由 Invitrogen 生物公司合成。

1.4 基因组 DNA 抽提 采集全血样本,基因组抽提参照 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒[爱思进生物技术(杭州)有限公司]说明书进行,所有

DNA 样本置于-20℃保存。

1.5 目的基因 SNP 检测 采用 PCR-LDR(polymerase chain reaction-ligation detection reaction,聚合酶链反应-高温连接酶检测反应)技术检测样本 DNA 目的序列。

PCR 反应体系 20 μl,反应条件:95℃预变性 15 min;94℃变性 30 s、56℃退火 90 s、72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 7 min。将 PCR 扩增产物加样至 3%琼脂糖凝胶电泳检测,观察效果,确定其作为模板在 LDR 反应中加入的量。

LDR 反应体系 10 μl,反应条件:95℃预变性 2 min;94℃变性 30 s、56℃退火 2 min、72℃延伸 1 min,30 个循环。取 1 μl 产物于 95℃变性 3 min 后立即冰水浴,然后用 ABI-377 型 DNA 测序仪(美国 ABI 公司)测序分型,结果采用 GeneMapper 软件分析(图 1)。

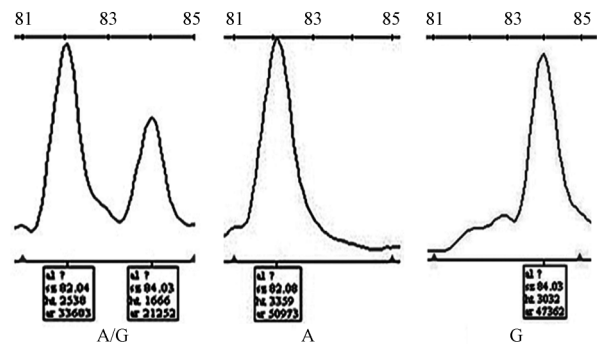


图 1 PCR-LDR 基因分型结果(以 A/G 为例)

Fig 1 Results of genotyping by PCR-LDR(A/G)

PCR-LDR: Polymerase chain reaction-ligation detection reaction

1.6 检测血清总 IgE 哮喘组和健康对照组血清总 IgE 浓度采用颗粒增强免疫散射比浊法,经全自动蛋白分析仪(BN II 型,Simens 公司)检测。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。样本的群体代表性经 Hardy-Weinberg 平衡检测确认;组间基因型分布和基因型组合均采用 χ<sup>2</sup> 检验分析。血清总 IgE 水平组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水平(α)为 0.05。

### 2 结果

2.1 哮喘组和健康对照组 IL-17 基因型和等位基因频率分布 实验过程中受试者的个别位点基因型检测不出,不纳入分析。经 χ<sup>2</sup> 检验,哮喘组和健康对照组 IL-17 基因型启动子区各 SNP 位点基因型及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明其基因频率已达到遗传平衡,具有群体代表性。由表 1、表 2 可见,哮喘组 rs8193036、rs3819024、rs2275913 基因型及等位基因分布频率与对照组比较差异无统计

学意义。两组间 rs4711998 位点等位基因频率无明显差异,但基因型分布差异有统计学意义( $P=0.03$ ),哮喘组 GG 纯合子基因型频率(9.6%,27/281)是健康对照组(4.1%,9/217)的 2.3 倍。

喘组 GG 纯合子基因型频率(9.6%,27/281)是健康对照组(4.1%,9/217)的 2.3 倍。

表 1 哮喘儿童组和健康儿童组 IL-17 单核苷酸多态性(SNPs)位点基因型分布

Tab 1 Genotype of IL-17 SNPs between asthma children and control subjects

Group	rs4711998			rs8193036			rs3819024			rs2275913		
	AA	AG	GG	CC	CT	TT	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Asthma	168	86	27	156	103	25	70	147	63	59	151	71
Control	127	81	9	114	90	13	51	109	57	53	110	53
P value	0.03			0.32			0.62			0.64		

表 2 哮喘儿童组和健康儿童组 IL-17 单核苷酸多态性(SNPs)位点等位基因频率分布比较

Tab 2 Comparison of allele frequencies of IL-17 SNPs between asthma children and control subjects

Group	rs4711998		rs8193036		rs3819024		rs2275913	
	A	G	C	T	A	G	A	G
Asthma	75.9	24.1	73.8	27.2	51.2	48.8	47.9	52.1
Control	77.2	22.8	73.3	26.7	48.6	51.4	50.0	50.0
P value	0.64		0.94		0.69		0.54	

2.2 IL-17 基因型与哮喘组血清总 IgE 水平的关系 在287 例患儿中共有 257 例能够检测到血清 IgE 水平,其余患儿因收集血清量偏低,未能检测到其血清总 IgE 浓度。经正态检验结果表明哮喘组血清总 IgE 水平不符合正态分布( $P<0.05$ ),故采用 Kruskal-Wallis 检验,结果显示哮喘组血清总 IgE 水平在 IL-17 基因 4 个位点基因型间差异均无统计学意义(图 2)。

### 3 讨论

过敏性哮喘属于 I 型变态反应性疾病,发病机制与 IgE 有关。当过敏原初次进入机体后,诱导 B 细胞产生特异性 IgE 抗体。IgE 与肥大细胞、嗜碱性粒细胞表面高度亲和力受体 FcεR I 结合,使机体处于致敏状态。当相同的抗原再次进入机体,多价抗原与活化效应细胞表面相邻的 IgE 结合,使膜 FcεR I 受体发生交联,激活信号下传,触发肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒,释放及合成生物活性介质,从而引起哮喘发作。大多数儿童哮喘都属于这一类型,此外还有极少数属于内源性哮喘。IL-17 是主要由 Th17 细胞产生的促炎性细胞因子,通过与其受体 IL-17RA 和 IL-17RC 结合促进 TNF-α、IL-1β、IL-6、GM-CSF 与 G-CSF 等一系列细胞因子的产生<sup>[4]</sup>。越来越多的研究发现并证实 IL-17 与哮喘关系密切,如哮喘患者的血清、肺泡灌洗液可溶性细胞因子检测和支气管活检免疫组化检测均表明 IL-17 蛋白合成和(或)IL-17 mRNA 表达增加,这种升高状态与患者呼吸道嗜酸性粒细胞数量以及气道高反应性的严重程度相关<sup>[5]</sup>,研究者认为 IL-17 在促进过敏性哮喘患者气道中性粒细胞募集过程中发挥重要作用。因此,IL-17 高表达是哮喘易发因素之一。

多基因扫描显示染色体组 6p 区域基因与哮喘及哮喘相关表型密切相关<sup>[6]</sup>。IL-17 基因位于染色体 6p12.1<sup>[3]</sup>,已有报道 IL-17 基因多态性位点与哮喘有关,可能是哮喘易感性的候选基因<sup>[7-8]</sup>。据此,

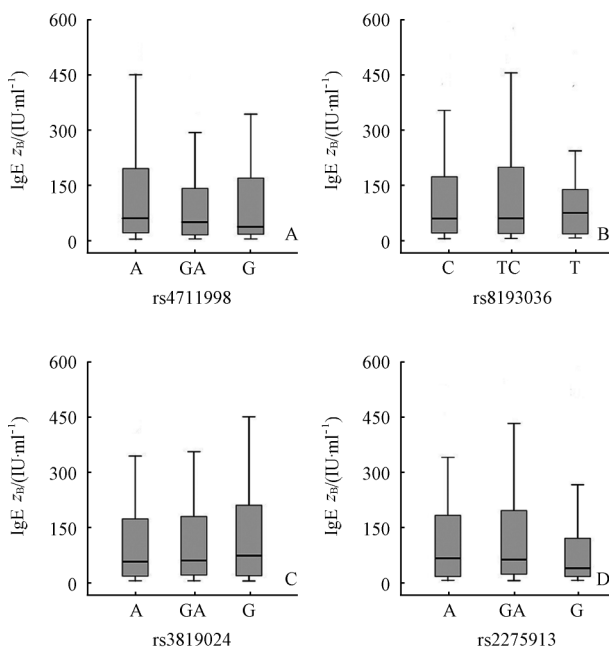


图 2 血清总 IgE 水平在不同基因型人群中的分布

Fig 2 Distribution of serum total IgE levels in population of different genotypes

A: rs4711998,  $P=0.76$ ; B: rs8193036,  $P=0.99$ ; C: rs3819024,  $P=0.90$ ; D: rs2275913,  $P=0.22$

IL-17 基因变异与过敏反应的相关性引起关注。有研究表明 IL-17 SNP rs2275913 A-152G 变异与日本人溃疡性结肠炎和白种人类风湿性关节炎<sup>[9]</sup>发生率密切相关外,IL-17 基因启动子区多态性与儿童哮喘发病的相关研究不断有报道。如,Chen 等<sup>[7]</sup>报道 IL-17 基因 rs2275913-152A>G 与儿童哮喘发生率相关;Wang 等<sup>[8]</sup>研究认为 rs8193036-692C>T 而非 rs2275913 A-152G 与儿童哮喘相关。SNP rs4711998 位于 IL-17 mRNA 起始位点上游-832 碱基处(A-832G)<sup>[3]</sup>,目前尚未发现该位点与哮喘发病率之间具有相关性。

人类认识和研究过敏反应已有 100 多年的历史,目前认为过敏性疾病是一类受多基因遗传和环境因素影响的免疫性疾病。大量的致力于解释“过敏体质”本质的研究均集中在探寻过敏反应的易感基因。如有学者发现 FcεR I α 近端启动子区两个重要的 SNP 位点 -66T>C(rs2251746)和 -315C>T(rs2427827)的基因变异与过敏性疾病或血清中总 IgE 水平相关<sup>[10-11]</sup>。-315C>T 基因变异产生新的转录因子结合基序,能够促进 FcεR I α 转录激活,并且与血清总 IgE 水平密切相关,证实了 FcεR I 表达水平对 IgE 表达的调节作用。本课题组也发现位于 FcεR I α 外显子 1A 上游启动子区的 rs2427827 基因突变与特应性皮炎的发生密切相关,rs2427827 低频等位基因 A 增加特应性皮炎发生的风险<sup>[12]</sup>。

为深入探寻过敏的遗传易感基因,结合 IL-17 与过敏性疾病的密切关系,本实验分析了 IL-17 基因多态性与儿童哮喘的相关性。结果发现 IL-17 基因 SNP 位点 rs4711998 A/G 与儿童哮喘密切相关,哮喘组 GG 纯合子的频率明显高于健康对照组;同时对儿童哮喘组基因型间血清总 IgE 水平的比较分析表明 IL-17 基因多态性与血清总 IgE 水平无明显相关。rs4711998 A-832G 基因型在哮喘组和对照组间的差异显著,哮喘组 GG 纯合子的频率是对照组的 2.3 倍,但等位基因频率则在两组间无差别(P=0.64),其可能原因是:(1)等位基因 G 为隐性,基因型为 GG 时哮喘的发病率显著升高;(2)rs4711998 位点位于 IL-17 的启动子区,当该位点基因型为由 A 变异为 G 后可能导致 IL-17 转录水平的改变,进一步导致 IL-17 蛋白表达水平的变化从而影响哮喘的发生发展。本研究发现哮喘发病与 IL-17 基因 SNP A-832G 的关联与 Chen 等<sup>[7]</sup>和 Wang 等<sup>[8]</sup>研究结果不同,其可能的原因是研究受到样本代表的群体性及样本量的影响。

IgE 与其高亲和力受体 FcεR<sub>1</sub>结合是过敏性哮喘

发病机制中至关重要的环节,因此本次实验同时检测了哮喘组患儿血清总 IgE 水平,以期了解 IL-17 对 IgE 是否具有调节作用。结果未发现 IL-17 SNP 位点其基因型与血清总 IgE 水平之间的相关性,这与 Chen 等<sup>[7]</sup>研究结果相一致,目前尚未见 IL-17 影响患者血清总 IgE 水平的报道。推测 IL-17 对过敏反应的调节作用与其基因变异无关,或许是通过调节细胞因子的表达从而间接调节过敏反应。本次研究结果再次佐证了 IL-17 极可能是一个儿童哮喘的易感基因,但 IL-17 基因在哮喘发病机制中的作用及其是否调节 IL-17 表达水平有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Yssel H, Groux H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, 121:10-18.

[2] Zhao Y, Yang J, Gao Y D, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 151: 297-307.

[3] Wang J Y, Lin C G, Bey M S, Wang L, Lin F Y, Huang L, et al. Discovery of genetic difference between asthmatic children with high IgE level and normal IgE level by whole genome linkage disequilibrium mapping using 763 autosomal STR markers[J]. *J Hum Genet*, 2005, 50:249-258.

[4] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V K. IL-17 and Th17 Cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27:485-517.

[5] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178:1023-1032.

[6] Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, et al. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group[J]. *Genomics*, 1999, 58:1-8.

[7] Chen J, Deng Y, Zhao J, Luo Z, Peng W, Yang J, et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30:539-545.

[8] Wang J Y, Shyr S D, Wang W H, Liou Y H, Lin C G, Wu Y J, et al. The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population [J]. *Allergy*, 2009, 64:1056-1060.

[9] Nordang G B, Viken M K, Hollis-Moffatt J E, Merriman T R, Førre ØT, Helgetveit K, et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48:367-370.

[10] Potaczek D P, Sanak M, Mastalerz L, Setkiewicz M, Kaczor M, Nizankowska E, et al. The α-chain of high-affinity receptor for IgE (FcεR I α) gene polymorphisms and serum IgE levels[J]. *Allergy*, 2006, 61:1230-1233.

[11] Gould H J, Sutton B J. IgE in allergy and asthma today[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8:205-217.

[12] 周娟,王海诚,王娟,蔺丽慧,李佳,彭霞,等. FCER1A 启动子区基因多态性与儿童哮喘[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5:1566-1569.

[本文编辑] 孙岩