



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2020.09.014

http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.09.014

· 论著摘要 ·

糖皮质激素诱导转录因子 1 基因中 rs37973 位点基因型对哮喘发病的影响

肖虹 朱卫华 刘恺丰 王庆义

[关键词] 糖皮质激素诱导转录因子 1 基因; rs37973 位点; 基因型; 哮喘

近年来,哮喘的发病率和死亡率明显升高,其发病涉及遗传、吸烟、环境污染等多种因素。有研究发现,哮喘患者存在明显的家族聚集倾向,遗传度达到 60.0% ~ 80.0%^[1],这为研究哮喘的发病机制和分子遗传学诊断提供了重要思路。近年来,全基因组关联分析(GWAS)的迅猛发展为基因研究提供了全新手段,与传统候选基因相联分析比较具有一定优势。药物基因组学研究发现,糖皮质激素诱导转录因子 1 (GLGGII) 基因可明显降低糖皮质激素治疗的反应性^[2],且 rs37973 位点突变起重要作用,其多态性可有效预测糖皮质激素治疗效果。本研究对哮喘患者 GLGGII 基因 rs37973 位点多态性与哮喘发病的相关性进行分析,为哮喘的早期预防、诊断及治疗提供指导。

对象与方法

1. 对象:2017 年 6 月 ~ 2018 年 10 月郑州颐和医院收治的哮喘患者 332 例(观察组),所有患者均符合 2016 年版《支气管哮喘防治指南》^[3]关于哮喘的诊断标准。纳入标准:(1)近 4 周未使用全身糖皮质激素或白三烯调节剂治疗;(2)近 4 周内无感染性疾病,无合并严重的心脑血管、肝脏、肾、肺等实质性脏器疾病,无过敏性鼻炎、皮炎等疾病。选取同期于我院体检的 240 例健康者作为对照组。其中观察组男 195 例,女 137 例,年龄 18 ~ 65 岁,平均年龄(38.27 ± 8.39)岁,病程 0.6 ~ 10.3 年,平均病程(4.54 ± 2.14)年,轻度哮喘 74 例、中度哮喘 193 例、重度哮喘 61 例;对照组男 137 例,女 103 例,年龄 19 ~ 69 岁,平均年龄(37.95 ± 9.41)岁。两组受试者性别、年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究经郑州颐和医院伦理委员会审核批准。

2. 方法

(1)GLGGII 基因检测:抽取两组受试者外周静脉血 5 ml,置于抗凝管中并加入乙二胺四乙酸二钠(EDTANa₂)抗凝处理,经 3 000 r/min 离心 10 min,随后吸取出白细胞层,采用改良碘化钠法提取基因组 DNA 待测。聚合酶链反应(PCR)引物序列:上游:5'-CGAAGATGCAGCGAGCTACG-3';下游:5'-GGTACGAGCTAGGAGCAACT-3',引物购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,扩增长度为 526 bp。PCR 反应系统包括 10 × Buffer 缓冲液(25 μl)、2.5 mmol/L 脱氧核糖核苷酸(dNTP)混合物(10 μl)、

基因组 DNA(1 μl)、上游和下游引物(各 1 μl)、Tap DNA 聚合酶(1.25 U),共 50 μl。PCR 反应过程按照说明书进行。取 6 μl 含载样缓冲液 PCR 扩增产物,加入含溴化乙锭 2% 琼脂糖凝胶行电泳实验。采用 3730 测序仪对 PCR 扩增产物进行双向测序反应,同时采用 BLAST 软件分析,将测序结果与数据库中已登录序列进行同源性分析。检测指标包括 GLGGII 基因 rs37973 位点基因型 AA、AG、GG 比例和 T、C 基因频率。

(2)肺功能检测:根据病情按需吸入糖皮质激素(ICS)后,采用日本美能 AS-507 肺功能检查仪对观察组患者的肺功能进行检测,包括第 1 秒用力呼气容积(FEV₁)、FEV₁/用力肺活量(FVC),重复进行 3 次,取其中患者配合、肺功能图像和数据最佳的 1 次作为最终结果。

(3)外周血嗜酸性粒细胞(EOS)百分比检测:抽取观察组患者外周静脉血 5 ml,经 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,于 -70 °C 低温保存。采用 SysmexXS-1800i 型全自动血液分析仪及其原配套试剂检测 EOS 百分比。

3. 统计学方法:应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用方差分析;计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用单变量 logistic 回归分析探讨各基因型对哮喘发病的相对危险度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 对照组和观察组受试者 GLGGII 基因 rs37973 位点基因型和等位基因频率比较:观察组 AG 基因型患者比例和 G 等位基因频率明显高于对照组,AA 基因型患者比例和 A 等位基因频率明显低于对照组($P < 0.05$),两组 GG 基因型患者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 对照组和观察组受试者 GLGGII 基因 rs37973 位点基因型和等位基因频率比较[例,(%)]

组别	例数	基因型			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
对照组	240	108(45.00)	100(41.67)	32(13.33)	316(65.83)	164(34.17)
观察组	332	76(22.90) ^a	204(61.45) ^a	52(15.66)	356(53.61) ^a	308(46.39) ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

2. 不同基因型哮喘患者肺功能及外周血 EOS 百分比比较:AG 组患者 FEV₁ 和 FEV₁/FVC 均明显低于 AA 组和 GG 组,外周血 EOS 百分比明显高于 AA 组和 GG 组($P < 0.05$),而 AA 组和

作者单位:450018 郑州,郑州颐和医院心肺功能科(肖虹),呼吸内科(朱卫华、刘恺丰);河南省人民医院心肺功能科(王庆义)

GG 组患者 FEV₁、FEV₁/FVC 及外周血 EOS 百分比比较差异均无统计学意义(P>0.05)。见表 2。

表 2 不同基因型哮喘患者肺功能及外周血 EOS 百分比比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FEV ₁ (L)	FEV ₁ /FVC(%)	EOS 百分比(%)
AA 组	76	2.71 ± 0.63	76.27 ± 3.36	4.17 ± 0.83
AG 组	204	2.05 ± 0.44 ^a	71.45 ± 3.10 ^a	6.05 ± 0.96 ^a
GG 组	52	2.62 ± 0.39 ^b	75.62 ± 3.52 ^b	4.92 ± 0.81 ^b

注:与 AA 组比较,^aP<0.05;与 AG 组比较,^bP<0.05

3. GLGGII 基因 rs37973 位点基因型对哮喘发病的相对危险度分析:单变量 logistic 回归分析结果显示, GLGGII 基因 rs37973 位点 AG 基因型和 AG + GG 均是哮喘发病的相对危险因素(P<0.05)。见表 3。

表 3 GLGGII 基因 rs37973 位点基因型对哮喘发病的相对危险度分析[例, (%)]

基因型	对照组	观察组	95% CI	P 值
AA	108(45.00)	76(22.90)	-	-
AG(加性模型)	100(41.67)	204(61.45)	0.912 ~ 3.425	0.007
GG(共显性模型)	32(13.33)	52(15.66)	1.104 ~ 7.053	0.366
AG + GG(显性模型)	132(55.00)	256(77.10)	1.351 ~ 5.289	0.009
GG 对 AG + AA(隐性模型)	208(86.67)	280(84.34)	0.327 ~ 1.183	0.138
AA + GG 对 AG(超显性模型)	140(58.33)	128(38.56)	0.425 ~ 1.736	0.285
A(乘积模型)	316(65.83)	356(53.61)	0.239 ~ 0.947	0.003
G(乘积模型)	164(34.17)	308(46.39)	1.048 ~ 3.836	0.001

讨 论

ICS 治疗是目前哮喘治疗指南推荐的方案,能明显改善患者症状,减少哮喘急性发作次数,改善其肺功能^[4]。但在临床实际治疗过程中发现,部分患者即使规范 ICS,其病情仍迁延难愈,重者可出现肺功能恶化、EOS 计数增多及激素抵抗现象,被称为激素抵抗型(SR)哮喘^[5]。SR 哮喘患者虽所占比例不高,仅约 5.0% 左右,但其治疗难度高、疗效差,对患者的危害极大。有研究发现,某些基因变异体与哮喘疗效密切相关^[6],提示基因多态性可能影响哮喘治疗的有效性,通过基因测定进而选取个性化哮喘治疗方案,为哮喘治疗提供了全新的思路。药物遗传学研究结果显示,对接受 ICS 治疗的哮喘患者,定位基因和单核苷酸序列,并分析其与肺功能、哮喘急性发作次数等指标的相关性,可为哮喘治疗提供基因层面靶点^[7]。

GLGGII 是糖皮质激素发挥疗效途径中的重要候选基因,其位于 7p21.3,基因中含有 8 个外显子。国外已有关于 GLGGII 基因与哮喘 ICS 治疗疗效相关性的报道^[8]。Tantisira 等^[9]的研究结果发现,单核苷酸多态性(SNP) rs37973 与哮喘患者 ICS 反应时的肺功能呈线性相关,其定位于 GLGGII 基因,且二者显现出完全连锁不平衡关系,该位点多态性能有效预测患者 ICS 治疗的反应性。一项对白种人的研究发现, GLGGII 基因 rs37973 位点主要等位基因为 A,次要等位基因为 G,其中 G 基因频率为 44.0%,携带 rs37973 位点次要等位基因能增加 ICS 抵抗,且在排除其他因素影响后,携带纯合子主要等位基因哮喘患者的肺功能改善率明显高于纯合子次要等位基因患者^[10]。相关文献报道, GLGGII 基因表达升高可能为细胞凋亡的早期信号,而 ICS 作

用机制为抑制多种炎症细胞、细胞因子释放及活化,其中促进凋亡是其重要作用机制,而变异型的出现可能抑制 GLGGII 基因表达,减少炎症细胞凋亡数量,最终引起 ICS 抵抗。本研究结果显示,观察组 GLGGII 基因 rs37973 位点 AG 基因型患者比例明显高于对照组,次要等位基因 G 频率明显高于对照组,同时比较 ICS 对不同基因型哮喘患者的疗效发现, AG 组患者 FEV₁ 和 FEV₁/FVC 均明显低于 AA 组和 GG 组, EOS 百分比数明显高于 AA 组和 GG 组,提示次要等位基因 G 可能增加哮喘的发生风险^[11],同时 AG 和 GG 基因型可能增加 ICS 抵抗。了解 GLGGII 基因 rs37973 位点多态性能预测哮喘对 ICS 的反应性,原因可能为 AG 和 GG 基因型可抑制 GLGGII 基因表达,使 GLGGII 介导的炎症细胞凋亡作用减弱,进而降低 ICS 改善肺功能的效应^[12]。单变量 logistic 回归分析结果显示, AG 基因型和 AG + GG 均是哮喘发病的相对危险因素,证实 GLGGII 基因 rs37973 位点中 G 等位基因可能增加哮喘的发病风险。但本研究样本量偏小,结论可能存在一定偏倚,需后续增加样本量深入研究。

综上所述,哮喘患者 GLGGII 基因 rs37973 位点存在基因多态性,且其多态性与哮喘的发病密切相关, rs37973 位点等位基因 A 向 G 突变可增加哮喘的发病风险,同时 AG 基因型哮喘患者的肺功能较 AA 和 GG 基因型差,对于此类患者,更应注重监测肺功能。

参 考 文 献

- [1] Aslanian-Kalkhoran L, Elieh-Ali-Komi D, Sadeghi-Shabestari M, et al. Investigation of Fc Receptor-Like 3 (FCRL-3) Gene Polymorphism (rs7528684) with Susceptibility to Allergic Asthma in Iranian North-Western Azeri Population[J]. Clin Lab, 2017, 63(7): 1301-1305.
- [2] 丁颖,陆敏,董晓艳,等. GLCCII 基因多态性对吸入型糖皮质激素治疗儿童哮喘疗效的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 19(6): 353-358.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(9): 675-697.
- [4] Hussein IA, Jaber SH. Genotyping of IL-4-590 (C > T) gene in Iraqi asthma patients[J]. Dis Mark, 2017, 17(8): 580-587.
- [5] Charrad R, Kaabachi W, Berraies A, et al. IL-33 gene variants and protein expression in pediatric Tunisian asthmatic patients [J]. Cytokine, 2017, 11(1): 32-40.
- [6] 舒敬奎,戴路明,方利洲,等. β₂-AR 基因多态性对哮喘患者沙美特罗替卡松吸入治疗疗效的影响[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22(2): 310-313.
- [7] 蔡旭龙,林娜. 白介素-9 基因多态性及其血清水平与黑衣壮儿童哮喘发病的关系[J]. 广西医学, 2017, 39(1): 15-17.
- [8] Amarin JZ, Naffa RG, Suradi HH, et al. An intronic single-nucleotide polymorphism(rs13217795) in FOXO3 is associated with asthma and allergic rhinitis: a case-case-control study[J]. BMC Med Genet, 2017, 18(1): 132-139.
- [9] Tantisira KG, Damask A, Szeffler SJ, et al. Genome-wide association identifies the T Gene as a novel asthma pharmacogenetic locus[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(12): 1286-1293.
- [10] Ghosh A, Dutta S, Podder S, et al. Sensitivity to House Dust Mites Allergens with Atopic Asthma and Its Relationship with CD14 C (-159T) Polymorphism in Patients of West Bengal, India [J]. J Med Entomol, 2017, 55(1): 378-385.
- [11] 杨艳辉,李瑛,鲁衍强. ADRB2、MS4A2 基因多态性与哮喘的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2017, 22(6): 1254-1255.
- [12] Chen JB, Zhang J, Hu HZ, et al. Polymorphisms of TGFBI, TLE4 and MUC22 are associated with childhood asthma in Chinese population [J]. Allerg Et Immun, 2017, 45(5): 432-438.

(收稿日期:2019-05-13)

(本文编辑:周三凤)