

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.18.007

文章编号: 1005-8982(2017)18-0038-05

IL-2 及 IL-2R α 基因多态性与 汉族儿童支气管哮喘的关联

刘冬松¹, 刘安兵², 陈岳明²

(1. 浙江省金华市中医医院 检验科, 浙江 金华 321017; 2. 浙江省杭州市第一人民医院
检验科, 浙江 杭州 310006)

摘要:目的 探讨 IL-2(rs6822844)及 IL-2R α (rs2104286)基因多态性和汉族儿童支气管哮喘发生的关联。
方法 随机选取 144 例支气管哮喘患儿为病例组, 228 例健康儿童为对照组。用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)直接测序鉴定各位点基因型;同时采用 qRT-PCR 检测对照组 IL-2R α 各基因型外周血 IL-2R α 信使核糖核酸(mRNA)相对表达量,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各基因型血浆 sIL-2R α 水平。**结果** IL-2R α (rs2104286)位点等位基因 A 在病例组分布频率(86.8%)高于对照组(79.4%)(OR=1.708, 95%CI: 1.113, 2.629, P=0.010), 病例组中 AA 基因型分布频率(75.0%)高于对照组(62.3%)(OR=1.745, 95%CI: 1.058, 2.884, P=0.021);未发现 IL-2(rs6822844)位点有多态性分布。对照组中 IL-2R α (rs2104286)位点 AA 基因型个体外周血 IL-2R α mRNA 相对表达量以及血浆 sIL-2R α 水平均高于 AG 基因型(Z=-2.029 和 -2.361, P=0.043 和 0.018)。**结论** IL-2R α (rs2104286)基因多态性可能与汉族儿童支气管哮喘发生相关,而且该位点基因型可影响其转录及表达。

关键词: 支气管哮喘;基因多态性;白细胞介素 2;白细胞介素 2a 受体

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

Association of IL-2 and IL-2R α polymorphisms with bronchial asthma in Chinese Han children

Dong-song Liu¹, An-bing Liu², Yue-ming Chen²

(1. Department of Laboratory Medicine, Jinhua Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinhua, Zhejiang 321017, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310006, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between IL-2 (rs6822844) and IL-2R α (rs2104286) gene Polymorphisms and bronchial asthma in Chinese Han children. **Methods** A gender and age-matched case control study was conducted. A total of 144 children with bronchial asthma were enrolled into the case group and 228 healthy children into the control group randomly. The genotypes were determined by direct sequencing for the products of fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). The relative expression of IL-2R α mRNA in the peripheral blood was analyzed by real-time fluorescent PCR. The expression levels of plasma sIL-2R α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the different genotype carriers in the control group. **Results** The allele A distribution frequency of IL-2R α (rs2104286) in the case group (86.8%) was significantly higher than that of the control group (79.4%) [OR=1.708 (95% CI: 1.113, 2.629), P=0.010]. The AA genotype frequency distribution in the case group (75.0%) was higher than that of the control group (62.3%) [OR=1.745 (95% CI: 1.058, 2.884), P=0.021]. The

收稿日期: 2016-12-15

[通信作者] 陈岳明, E-mail: hzsylab@163.com

polymorphism distribution of IL-2 (rs6822844) was not found in the study. Additionally, both relative expression of IL-2R α mRNA in the peripheral blood and the plasma sIL-2R α level of the individuals with AA genotype were significantly higher than those with AG genotype in the control group ($P=0.043$ and 0.018 , respectively). **Conclusions** The gene polymorphism of IL-2R α (rs2104286) may be associated with the occurrence of bronchial asthma in Chinese Han children, and may regulate gene transcription and expression.

Keywords: bronchial asthma; gene polymorphism; interleukin-2; interleukin-2 receptor alpha

支气管哮喘是儿童常见的变态反应性疾病之一,是由肥大细胞、嗜酸性粒细胞及 T 淋巴细胞参与的慢性气道炎症并导致气道高反应,出现反复发作的喘息、呼吸困难、胸闷及咳嗽等症状。全球范围内哮喘发病越来越普遍,目前约有 3.34 亿人患病^[1]。2010 年中国国家儿童哮喘协作组调查显示儿童哮喘全国流行率约 0.42%~5.73%,全国平均水平约 2.32%^[2-3]。辅助性 T 细胞 1 型(T helper 1 cell,Th1)和辅助性 T 细胞 2 型(T helper 2 cel,Th2)比值失衡是哮喘发病的一个重要机制^[4]。白细胞介素 2(interleukin-2,IL-2)是 Th1 型细胞分泌的重要细胞因子。白细胞介素 2 α 受体(interleukin-2 receptor alpha,IL-2R α)与 IL-2 结合在调节免疫系统功能方面起关键作用。IL-2R α 脱落入血液后形成可溶性 IL-2R α (soluble interleukin-2 receptor alpha,sIL-2R α)。研究显示,支气管哮喘患者肺泡灌洗液 IL-2 水平升高,中度持续性哮喘患者血清 sIL-2R α 也高于轻度持续性哮喘患者^[5-6]。细胞因子的合成受遗传因素影响^[7],因此,哮喘除环境因素外,患者的遗传背景同样起重要作用。本研究以汉族支气管哮喘儿童为病例组,以汉族健康儿童为对照组,分析两组 IL-2(rs6822844)及 IL-2R α (rs2104286)多态性位点等位基因频率、基因型分布差异,旨在鉴定上述位点与汉族儿童支气管哮喘发生的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2013 年 8 月~2015 年 12 月在金华市中医医院和杭州市第一人民医院儿科门诊及住院的汉族支气管哮喘患儿。依据 2008 年中华医学会儿科学分会呼吸学组修订的儿童哮喘防治常规^[8]确诊为支气管哮喘的急性发作期儿童 144 例为病例组。其中,男性 79 例,女性 65 例;年龄 6 个月~11 岁,中位年龄 3.7 岁;病程 2 个月~7 年,中位数 2.4 年。以杭州市第一人民医院儿童保健门诊 228 例汉族健康儿童为对照组。其中,男性 123 例,女性 105 例;年龄 6 个月~10 岁,中位年龄 3.2 岁;无呼吸道及其他部位感

染以及过敏反应史;各组均除外有呼吸衰竭、心力衰竭及先天性心脏病等疾病者;病例组和对对照组间性别、年龄差异无统计学意义。所有研究对象均对本研究知情同意并签署知情同意书,本研究获得金华市中医医院及杭州市第一人民医院医学伦理委员会审核批准。

1.2 标本收集及基因组脱氧核糖核酸 DNA 提取

全部对象采集空腹乙二胺四乙酸二钾抗凝静脉血 2 ml 各 2 管。其中,1 管用于基因组 DNA 提取,采用全血基因组 DNA 提取试剂盒(购自北京天根生化科技有限公司),按照说明书进行操作,提取的 DNA 样本采用紫外分光光度计确定 DNA 的纯度和浓度,置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。另一管置 2000 r/min 离心 5 min 后,取血浆 1 ml 置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻备用。

1.3 基因型鉴定

实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)扩增引物均经在线软件设计(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),由上海辉睿生物技术有限公司合成。PCR 扩增体系包括:10 \times 缓冲液(无 Mg²⁺离子)5 μl ,脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate,dNTP)(10 mmol/L)4 μl ,Mg²⁺(25 mmol/L)3 μl ,正向引物(10 nmol/L)1 μl ,反向引物(10 nmol/L)1 μl ,模板 DNA 5 μl ,Taq DNA 聚合酶(5 u/ μl)1 μl ,用去离子水补齐至 50 μl 反应体系(日本 TaKaRa Bio 株式会社)。引物序列及扩增条件见表 1。PCR 产物由上海生工生物工程股份有限公司完成,测序引物为正向引物。

1.4 IL-2R α mRNA 相对表达量

按基因型结果,随机抽取对照组中 AA 基因型、AG 基因型标本各 50 例。用 Trizol(美国英维捷基公司)提取全血总 RNA,按照 Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit(立陶宛 Fermentas 公司)说明书操作合成互补 DNA(complementary DNA,cDNA)。SYBR Green I qRT-PCR 检测 IL-2R α mRNA 相对表达量,扩增引物分别为,正向引物:5'-GGTCCC AGGCAGAGAATCAT-3';反向引物:5'-CACCTTGTC

表 1 候选基因 PCR 引物序列及扩增条件

基因位点	引物序列	PCR 扩增条件	产物长度 /bp
<i>IL-2</i> (rs6822844)	正向:5'-GTCCAAGGACACAGGCTTCTT-3' 反向:5'-AAATTTGGCTGGTGCCAAGG-3'	95℃变性 5 min;40 个循环包括:95℃变性 30 s, 53℃退火 30 s,72℃延伸 30 s;最后 72℃延伸 5 min	200
<i>IL-2Rα</i> (rs2104286)	正向:5'-CCCTTTCATGTCACCCTCA-3' 反向:5'-CGCAAAAACCTCACTCACTCAA-3'	95℃变性 5 min;40 个循环包括:95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s;最后 72℃延伸 5 min	233

TGTCACCTGTA-3'。以 β - 肌动蛋白(beta-actin, β -actin)作为内参照基因,正向引物:5'-CTACAATG AGCTGCGTGTGG-3';反向引物:5'-AAGGAAGGCTG GAAGAGTGC-3'。由上海辉睿生物技术有限公司合成。qRT-PCR 检测试剂购自日本 TaKaRa Bio 株式会社,反应体系按说明书进行配制。PCR 反应循环参数为:95℃变性 3 min 后进行 40 个循环,包括 95℃变性 10 s,60℃退火和延伸 34 s。根据 2^{-ΔΔCt} 法来计算 *IL-2Rα* mRNA 相对表达量^[9]。

1.5 血浆 sIL-2Rα 水平检测

上述对照组中 AA 基因型、AG 基因型标本相对应的血浆 sIL-2Rα 检测采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)(美国 Creative Diagnostics 公司)。该试剂检测线性范围 31.25 ~ 2 000.00 pg/ml,检测下限为 16 pg/ml。实验操作严格按说明书进行。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,Hardy-Weinberg 遗传平衡定律吻合度检验、病例与对照组基因型和等位基因频率分布均用 χ² 检验;关联分析用 95%可信区间(confidence interval,CI)的比值比(odds ratio,OR)表示。不同基因型个体间 *IL-2Rα* mRNA 相对表达量及血浆 sIL-2Rα 水平用 Mann-

Whitney 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 候选基因位点等位基因频率及基因型分布

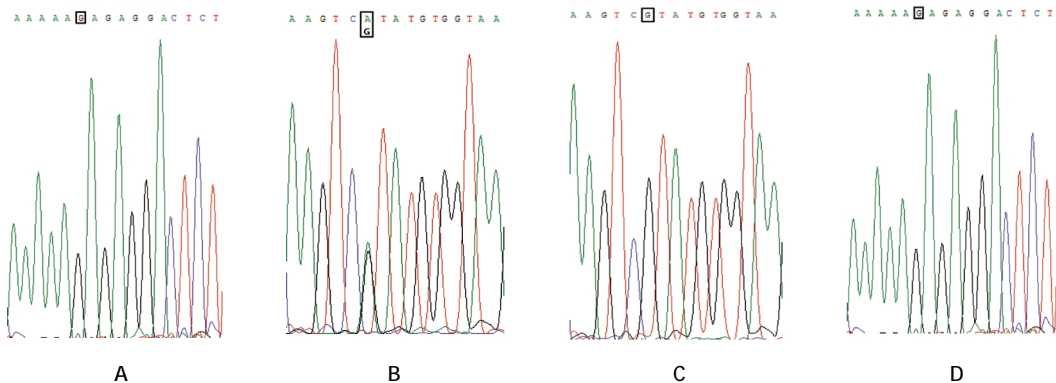
本研究未发现 *IL-2*(rs6822844)位点有多态性分布,该位点等位基因均为 G。*IL-2Rα* (rs2104286)位点等位基因及基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律(χ²=0.517, P > 0.050)基因型测序结果。*IL-2Rα* (rs2104286)位点等位基因 A 在病例组分布频率(86.8%)高于对照组(79.4%)(OR=1.708, 95%CI=1.113, 2.629, P=0.010);病例组中 AA 基因型分布频率(75.0%)高于对照组(62.3%)(OR=1.745, 95%CI=1.058, 2.884, P=0.021)。见图 1 和表 2。

2.2 *IL-2Rα* mRNA 相对表达量

AA 基因型携带者相对表达量(1.263 ± 0.625)高于 AG 基因型携带者(1.044 ± 0.436)(Z=-2.029, P=0.043)。见图 2。

2.3 *IL-2Rα* (rs2104286)位点不同基因型个体血浆 sIL-2Rα 水平

AA 基因型个体血浆 sIL-2Rα 水平(157.86 ± 67.21)高于 AG 基因型(126.41 ± 58.63)(Z=-2.361, P=0.018)。见图 3。



A:rs2104286 AA 基因型;B:rs2104286 AG 基因型;C:rs2104286 GG 基因型;D:rs6822844 GG 基因型

图 1 *IL-2Rα* (rs2104286)、*IL-2* (rs6822844)位点基因型测序图

表 2 候选基因位点等位基因频率及基因型分布 例(%)

组别	IL-2R α (rs2104286)				
	AA 基因型	AG 基因型	GG 基因型	A 等位基因	G 等位基因
病例组(n=144)	108(75.0)	34(23.6)	2(1.4)	250(86.8)	38(13.2)
对照组(n=228)	142(62.3)	78(34.2)	8(3.5)	362(79.4)	94(20.6)
OR	1.745	1	- [†]	1.708	1
95%CI					
下限	1.058			1.113	
上限	2.884			2.629	
χ^2 值	5.352		- [†]	6.658	
P 值	0.021		- [†]	0.010	

注:† 样本量少未进行统计学处理

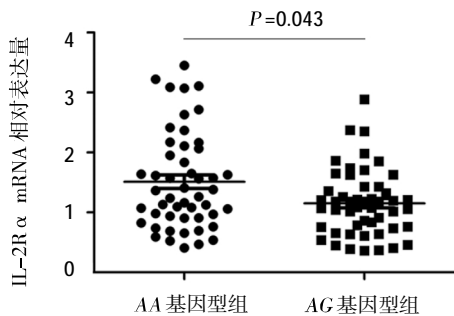


图 2 IL-2R α (rs2104286)位点不同基因型 IL-2R α mRNA 相对表达量

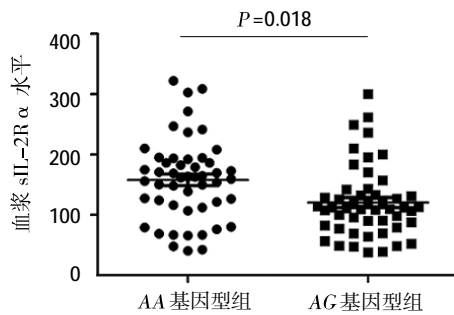


图 3 IL-2R α (rs2104286)位点不同基因型个体血浆 sIL-2R α 水平

3 讨论

IL-2 是诱导 Th1 细胞分化增殖的主要细胞因子之一,在哮喘患者中 IL-2 激活 Th2 细胞触发和维持气道炎症,刺激免疫球蛋白 E 分泌和黏液过度产生。T 细胞膜表面的 IL-2R α 脱落于血液形成 sIL-2R α , 其不但是 IL-2 介导免疫应答的调节拮抗蛋白,而且是一种类似封闭因子的免疫抑制物,能中和 T 细胞产生过多的 IL-2,起到免疫调控作用^[10]。

研究显示,IL-2(rs6822844)、IL-2R α (rs2104286) 均和 Th1/Th2 失衡相关疾病有关,如 IL-2(rs6822844)

位点与类风湿关节炎^[11]、系统性硬化病^[12];IL-2R α (rs2104286)位点和 1 型糖尿病^[13]及幼年特发性关节炎等^[14]。然而,上述位点与支气管哮喘发生的关联目前还少见报道,特别是在中国汉族儿童中。本研究结果显示,IL-2R α (rs2104286)位点等位基因 A 相对于 G 是致病基因;AA 基因型个体患病风险高于 AG 基因型个体。在本研究的样本量内未发现 IL-2(rs6822844)位点在中国汉族儿童中有多态性分布。

IL-2R α (rs2104286)位于该基因第一个内含子内。CHISTIYAKOV 等^[15]报道,对照组内 AA 基因型个体血清 sIL-2R α 水平均高于其他基因型,而在毒性弥漫性甲状腺肿病例组内各基因型间未发现差异。本研究同样发现,对照组中 AA 基因型个体外周血 IL-2R α mRNA 相对表达量以及血浆 sIL-2R α 水平均高于 AG 基因型,提示 rs2104286 可能是 IL-2R α 基因的一个功能性位点。许多自身免疫性疾病中 IL-2R α (CD25)单抗在降低疾病活动性方面已显示出很好的疗效,其效应不仅直接作用于 T 细胞,而且作用于自然杀伤细胞和树突状细胞^[16]。最近,针对细胞因子在哮喘患者炎症级联反应中的复杂作用,学者们同样认为 IL-2R α 拮抗剂可能是一个治疗哮喘有希望的药物^[17]。

综上所述,IL-2R α (rs2104286)可能与汉族儿童支气管哮喘发生相关,而且该位点可影响基因转录及表达。此外,研究结果还提示,IL-2R α 可能是治疗哮喘的一个潜在、有效的靶点,其基因型同时在指导个体化用药方面有临床意义。

参 考 文 献:

[1] ASHER I, PEARCE N. Global burden of asthma among children[J].

- International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2014, 18 (11): 1269-1278.
- [2] CHEN Z H, WANG P L, SHEN H H. Asthma research in China: a five-year review[J]. *Respirology*, 2013, 18(3): 10-19.
- [3] National Cooperative Group on Childhood Asthma, Institute of Environmental Health and Related Product Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention. Third nationwide survey of childhood asthma in urban areas of China[J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2013, 51(10): 729-735.
- [4] BARNES P J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(3): 183-192.
- [5] PUMPUTIENE I, EMUZYTE R, DUBAKIENE R, et al. T cell and eosinophil activation in mild and moderate atopic and nonatopic children's asthma in remission[J]. *Allergy*, 2006, 61(1): 43-48.
- [6] LAMA M, CHATTERJEE M, NAYAK C R, et al. Increased interleukin-4 and decreased interferon-1658970 in serum of children with asthma[J]. *Cytokine*, 2011, 55(3): 335-338.
- [7] AKALIN E, MURPHY B. Gene polymorphisms and transplantation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2001, 13(5): 572-576.
- [8] 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.
- [9] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C(T) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease[J]. *Alternative Medicine Review*, 2003, 8(3): 223-246.
- [11] LOUAHCHI S, ALLAM I, RAAF N, et al. Association of rs6822844 within the KIAA1109/TENR/IL2/IL21 locus with rheumatoid arthritis in the algerian population[J]. *HLA*, 2016, 87(3): 160-164.
- [12] DIAZ-GALLO L M, SIMEON C P, BROEN J C, et al. Implication of IL-2/IL-21 region in systemic sclerosis genetic susceptibility[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(7): 1233-1238.
- [13] TANG W, CUI D, JIANG L, et al. Association of common polymorphisms in the IL-2RA gene with type 1 diabetes: evidence of 32,646 individuals from 10 independent studies[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(10): 2481-2488.
- [14] HINKS A, KE X, BARTON A, et al. Association of the IL-2RA/CD25 gene with juvenile idiopathic arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(1): 251-257.
- [15] CHISTIYAKOV D A, CHISTIYAKOVA E I, VORONOVA N V, et al. A variant of the IL-2RA/CD25 gene predisposing to graves' disease is associated with increased levels of soluble interleukin-2 receptor[J]. *Scand J Immunol*, 2011, 74(5): 496-501.
- [16] PFENDER N, MARTIN R. Daclizumab (anti-CD25) in multiple sclerosis[J]. *Exp Neurol*, 2014, (262): 44-51.
- [17] MENZELLA F, LUSUARDI M, GALEONE C, et al. Tailored therapy for severe asthma[J]. *Multidiscip Respir Med*, 2015, 10(1): 1.