

• 论 著 •

DENND1B 基因多态性与儿童哮喘关系的研究*

李 佳, 周 娟, 王 娟, 蔺丽慧, 彭 霞, 刘亚楠, 李 莉[△]

(上海交通大学医学院附属第一人民医院检验科 200080)

摘 要:目的 探讨 DENND1B 基因多态性在儿童哮喘患者中的分布及其与患者血清 IgE 水平的关系。方法 选取哮喘儿童 296 例(哮喘组), 同期健康体检儿童 225 例(健康对照组), 同时提取外周血基因组 DNA, 通过高温连接酶检测法(PCR-LDR)检测 DENND1B 基因 rs1747815、rs1775444、rs1775456 位点的基因型。采用免疫散射比浊法检测样本血清总 IgE 水平。结果 rs1747815 位点 3 组基因型(GG/GA/AA)及 rs1775456 位点 3 组基因型(AA/GA/GG)在健康对照组与哮喘组分布频率差异无统计学意义($P>0.05$)。rs1775444 位点 3 组基因型(CC/TC/TT)在健康对照组与哮喘组分布频率差异有统计学意义($P<0.05$), 其中, 哮喘组 3 种基因型患者中血清 IgE 水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 DENND1B 基因多态性与儿童哮喘有一定相关性, 但与哮喘患者血清 IgE 水平无相关性。

关键词:基因; 多态现象, 遗传; 哮喘; 受体, IgE

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0723-03

Association of single nucleotide polymorphisms in DENND1B gene with childhood asthma*

Li Jia, Zhou Juan, Wang Juan, Lin Lihui, Peng Xia, Liu Ya'nan, Li Li

(Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200080, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association between DENND1B gene polymorphisms and childhood asthma. **Methods** Blood samples of 296 children with asthma and 225 children without history of allergic diseases were collected. Genomic DNA were extracted from all blood samples, PCR-LDR reaction was employed to detect the rs1747815, rs1775444 and rs1775456 mutation in DENND1B gene. Genotype and allele distribution were analyzed. Meantime, total serum IgE levels were detected in patients with asthma in different genotypes. **Results** There was no significant difference in genotype and genotypic distribution of SNP loci rs1747815 and rs1775456 between asthma group and control group ($P>0.05$). However, significant difference in genotypic distribution of rs1775444 between these two groups was detected ($P<0.05$). In asthma group, genotype and genotypic distribution of SNP loci rs1775444 were not related with total serum IgE levels ($P>0.05$). **Conclusion** rs1775444CT genotype is significantly associated with childhood asthma, but not associated with total serum IgE levels.

Key words: genes; polymorphism, genetic; asthma; receptors, IgE

哮喘是以发作性喘息、咳嗽、气急为表现的复杂的多基因遗传病, 临床上以气道高反应、炎症和 IgE 升高为特征。相关研究表明, 儿童哮喘与环境、遗传等多种因素相关。哮喘易感性相关遗传因素的研究对于选择过敏性疾病预防和治疗的靶点至关重要, 但迄今为止相关研究仍在探索之中^[1]。2007 年, Moffatt 等第一次通过全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWS)证实了 ORMDL3 基因多态性与儿童哮喘易感性高度相关, 其研究结果表明, 遗传变异所调控的 ORMDL3 基因的表达水平是儿童哮喘易感性的因素之一^[2-4]。有学者报道, 在染色体 1q31.3 位点上新识别了一个包含 DENND1B 的基因, 该基因与儿童哮喘易感性极为相关, 并且该相关性在欧裔患者及非裔北美患者中具有可重复性^[5-6]。据此, 现分析 DENND1B 基因上的 3 个多态性位点 rs1747815、rs1775444、rs1775456 在哮喘儿童中的分布及其与患儿血清 IgE 水平的关系, 以探讨儿童哮喘易感基因。

1 资料与方法

1.1 一般资料 哮喘组: 2010 年 4~7 月就诊于该院哮喘专科门诊的哮喘患儿 296 例, 男 182 例, 女 114 例, 年龄 1~12 岁; 患儿均符合 2006 年全球哮喘倡议(GINA)委员会修订的儿童

哮喘诊断标准^[7-8]。健康对照组: 取自同期健康儿童, 共 225 例, 男 119 例, 女 106 例, 年龄 1~12 岁; 经问卷调查明确儿童及直系亲属中无哮喘或其他过敏性疾病史。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用 AxyPrep 全基因组 DNA 小量试剂盒提取外周血基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液, -20°C 保存。

1.2.2 引物设计与合成 根据 Genebank 公布的 DENND1B 基因序列(NT_004487.19), 设计 3 个位点引物各 1 对: rs1747815 上游引物 5'-ATT TCA GAA GGG GGT GCA G-3', 下游引物 5'-GCA CTT CCT ACC CAA TTC CA-3'; rs1775444 上游引物 5'-CAA CCT AGG ATC ACT CCT TGC-3', 下游引物 5'-CCT TGG AGG AAA GTC TGC TG-3'; rs1775456 上游引物 5'-TGA CTT GAA ATT GAC GCT TCC-3', 下游引物 5'-AAC CCC TGA CTG ATT CTA GGC-3'。PCR 引物和高温度连接酶检测反应(ligase detection reaction, LDR)探针由 Invitrogen 生物公司合成。

1.2.3 多态性位点基因型检测 采用 PCR 技术和 LDR 检测样本 DNA 目的序列。多重 PCR 反应体系为 20 μL , 反应循环

* 基金项目: 上海市科委长三角科技联合攻关项目资助(10495810200); 国家自然科学基金资助(30972824); 上海交通大学重大项目培育基金资助。 [△] 通讯作者, E-mail: annylish@hotmail.com。

参数为 95 ℃ 预变性 15 min;94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 1 min 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 次循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。3%的琼脂糖凝胶电泳检测,观察 PCR 产物的效果,确定其作为模板在 LDR 反应中加入的量。LDR 反应体系为 10 μL,反应循环参数为 95 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 反应 2 min,共 35 次循环。产物经 ABI 377 电泳测序,结果运用 Genemapper software 进行数据分析。

1.2.4 血清总 IgE 检测 哮喘组和健康对照组血清总 IgE 浓度采用颗粒增强的免疫散射比浊法,通过 SIEMANS BN II 全自动蛋白分析仪检测。

1.3 统计学处理 全部数据采用 SAS 软件进行统计分析。基因型和等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,各基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验。各基因型患者血清 IgE 水平比较采用 Kruskal Wallis 检验和 Wilcoxon 秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 多态性位点在哮喘组及健康对照组中的分布 经 χ^2 检验,哮喘组和健康对照组 rs1747815、rs1775444、rs1775456 位

点基因型及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,在健康对照组及哮喘组均发现各种基因型。rs1747815、rs1775456 位点基因型及等位基因频率分布在健康对照组和哮喘组间,差异无统计学意义($P>0.05$)(见表 1~2);rs1775444 位点 3 组基因型及等位基因频率分布在两组间差异有统计学意义($P<0.05$),其中,哮喘组 TC 和 TT 基因型频率明显低于健康对照组,哮喘组 T 等位基因频率低于健康对照组,且在显性模式下,两组间 TC+TT 与 CC 基因型频率差异有统计学意义($P<0.05$)(见表 3~4)。

2.2 哮喘组 rs1775444 位点各基因型与血清总 IgE 水平的关系 在哮喘的发病机制中,IgE 具有重要且复杂的作用,并且 IgE 水平是哮喘病情严重程度及是否缓解的一个标准。为了初步探讨 DENND1B 基因多态性导致儿童哮喘易感性的机制,本组检测了 243 例儿童哮喘患者血清总 IgE 水平,分析其 rs1775444 位点基因型与血清总 IgE 水平的关系。结果显示,DENND1B 基因 rs1775444 位点各基因型患者血清总 IgE 水平差异无统计学意义($\chi^2=1.4428,P>0.05$)。

表 1 rs1747815 位点基因型与等位基因频率分布

组别	例数(<i>n</i>)	基因型[<i>n</i> (%)]			χ^2 值	<i>P</i> 值	等位基因[<i>n</i> (%)]		χ^2 值	<i>P</i> 值
		GG	GA	AA			G	A		
哮喘组	296	240(81.08)	51(17.23)	5(1.69)	1.475 7	0.478 1	531(89.70)	61(10.30)	1.317 3	0.251 1
健康对照组	210	161(76.67)	45(21.43)	4(1.90)	—	—	367(87.38)	53(12.62)	—	—

—:表示无数据。

表 2 rs1775456 位点基因型与等位基因频率分布

组别	例数(<i>n</i>)	基因型			χ^2 值	<i>P</i> 值	等位基因		χ^2 值	<i>P</i> 值
		AA	GA	GG			A	G		
哮喘组	294	225(76.53)	66(22.45)	3(1.02)	2.599 4	0.272 6	516(87.76)	72(12.24)	1.794 7	0.180 4
健康对照组	225	163(72.44)	56(24.89)	6(2.67)	—	—	382(84.89)	68(15.11)	—	—

—:表示无数据。

表 3 rs1775444 位点基因型与等位基因频率分布

组别	例数(<i>n</i>)	基因型			χ^2 值	<i>P</i> 值	等位基因		χ^2 值	<i>P</i> 值
		CC	TC	TT			C	T		
哮喘组	296	242(81.76)	51(17.23)	3(1.01)	7.949 1	0.018 8	535(90.37)	57(9.63)	8.141 1	0.004 3
健康对照组	223	160(71.75)	57(25.56)	6(2.69)	—	—	377(84.53)	69(15.47)	—	—

—:表示无数据。

表 4 rs1775444 位点隐性突变和显性突变模式下基因型分布

组别	例数(<i>n</i>)	隐性突变		χ^2 值	<i>P</i> 值	显性突变		χ^2 值	<i>P</i> 值
		TT	CC+TC			TC+TT	CC		
哮喘组	296	3(1.01)	293(98.99)	2.099 2	0.147 4	54(18.24)	242(81.76)	7.295 2	0.006 9
健康对照组	223	6(2.69)	217(97.31)	—	—	63(28.25)	160(71.75)	—	—

—:表示无数据。

3 讨 论

哮喘是由遗传因素与各种环境因素共同作用导致的表型复杂的多基因遗传病。研究表明,哮喘患者的一级亲属患哮喘的风险是非哮喘患者一级亲属的 5~6 倍,遗传因素在哮喘的

病理、生理过程中发挥了重要作用^[9-10]。近年来,随着全基因组相关性研究在病例对照研究中的开展,一些新的哮喘基因不断被发现,DENND1B 基因就是继 ORMDL3 基因后发现的又一重要的哮喘易感基因^[5-6,11]。

DENND1B 基因编码一种胞内信号蛋白,该蛋白是 TNF- α I 型受体(TNF- α R I)结合蛋白的结合配体,能够负调控细胞因子引起的 TNF- α R I 信号转导^[12-13]。DENND1B 蛋白表达于 DC 细胞亚群和 NK 细胞,在活化 T 细胞中表达明显上调^[14]。在哮喘过程中,一部分活化的 T 细胞发育为 TH2 细胞,DENND1B 蛋白调控 TH1-TH2 细胞因子级联反应并通过抑制 TNF- α R I 信号转导调控其他炎症信号通路。

为了了解中国儿童哮喘与 DENND1B 基因多态性的关系,本研究选取 3 个 SNP 位点进行了检测分析^[6,15]。研究结果显示,rs1775444 位点 3 组基因型及等位基因频率分布在两组间的差异有统计学意义,其中,哮喘组 TC 和 TT 基因型频率明显低于健康对照组,哮喘组 T 等位基因频率低于健康对照组;这与国外文献中报道的欧裔人群和非裔儿童中的研究结果相反,提示该位点在中国哮喘儿童中可能为保护性 SNP 位点。此外,为了进一步探讨 DENND1B 基因多态性导致儿童哮喘易感性的机制,本研究分析了哮喘儿童 rs1775444 位点基因型与血清 IgE 水平的关系,结果显示哮喘儿童该位点基因型与血清 IgE 水平无关;提示该位点多态性并未导致患者血清 IgE 差异,DENND1B 基因多态性可能通过其他途径导致儿童哮喘易感性。

目前,DENND1B 蛋白在哮喘病理、生理过程中的作用仍然知之甚少,对于 DENND1B 基因多态性与哮喘易感性的关系,尚需在更多的人群中进行重复研究以及功能基因组研究^[1,16]。本研究是对 DENND1B 基因与儿童哮喘相关性的初步调查,更多大量样本的研究,以及 SNP 位点与 RNA 转录水平、细胞因子水平的关系仍在进一步研究之中。对 DENND1B 基因研究的不断深入将为哮喘基因的确立、哮喘的预测、防治和治疗提供新的线索和途径。

参考文献

[1] Meng JF, Rosenwasser LJ. Unraveling the genetic basis of asthma and allergic diseases[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2010, 2 (4): 215-227.

[2] Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. Nature, 2007, 448(7152): 470-473.

[3] Mathias RA, Grant AV, Rafaels N, et al. A genome-wide association study on African-ancestry populations for asthma[J]. J Aller-

gy Clin Immunol, 2010, 125(2): 336-346.

[4] Sleiman PM, Annaiah K, Imielinski M, et al. ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122 (6): 1225-1227.

[5] Marat AL, Mcpherson PS. Variants of DENND1B associated with asthma in children[J]. N Engl J Med, 2010, 363(10): 988-989.

[6] Sleiman PM, Flory J, Imielinski M, et al. Variants of DENND1B associated with asthma in children[J]. N Engl J Med, 2010, 362 (1): 36-44.

[7] 洪建国. 不断提高儿童支气管哮喘的诊治水平[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 721-723.

[8] 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[S]. 中华儿科杂志, 2008, 46 (10): 745-753.

[9] Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective[J]. Clin Mol Allergy, 2009, 7(1): 7.

[10] Pinto LA, Stein RT, Kabisch M. Impact of genetics in childhood asthma[J]. J Pediatr (Rio J), 2008, 84(4 Suppl): 68-75.

[11] Sleiman PM, Hakonarson H. Recent advances in the genetics and genomics of asthma and related traits[J]. Curr Opin Pediatr, 2010, 22(3): 307-312.

[12] Del VK, Miller CA. Down-regulation of DENN/MADD, a TNF receptor binding protein, correlates with neuronal cell death in Alzheimer's disease brain and hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(12): 4210-4215.

[13] Miyoshi J, Takai Y. Dual role of DENN/MADD (Rab3GEP) in neurotransmission and neuroprotection [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(10): 476-480.

[14] Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells[J]. J Immunol, 2005, 175 (8): 4839-4846.

[15] Himes BE, Lasky SJ, Wu AC, et al. Asthma-susceptibility variants identified using probands in case-control and family-based analyses[J]. BMC Med Genet, 2010, 11(6): 122.

[16] Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics[J]. Respir Res, 2008, 9(8): 4.

(收稿日期: 2010-08-12)

(上接第 722 页)

[3] Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody[J]. Bull WHO, 1973, 48(9): 535-541.

[5] King AA. Studies of the antigenic relationship of rabies and rabies-related viruses using antinucleocapsid monoclonal antibodies [J]. Guildford: University of Surrey, 1991.

[6] 严家新, 李承平, 朱家鸿, 等. 抗狂犬病病毒核蛋白荧光标记抗体的制备和初步鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2000, 16(5): 59-61.

[7] 苏焱, 王继麟, 杨想平, 等. 狂犬病毒核蛋白(NP)的纯化及其免疫原性的研究[J]. 中国病毒学, 2001, 16(1): 64-67.

[8] 尹伟, 徐洁萍, 张金阳, 等. 狂犬病核蛋白在 Bac-To-Bac/AcMNPV 杆状病毒系统的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(2): 86-89.

[9] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 93-110.

[10] Hideo G, Nobuyuki M, Hiroshi I, et al. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus[J]. Journal of General Virology, 2000, 81(11): 119-127.

[11] 俞永新. 中国预防控制狂犬病降低发病率的思考[J]. 中国计划免疫, 2007, 4(13): 391-398.

[12] Han S, Zhong MG, Yuan TH, et al. Rabies trend in China (1990-2007) and post-exposure prophylaxis in the Guangdong province [J]. BMC Infectious Diseases, 2008, 8(19): 113.

(收稿日期: 2011-01-10)