

ORMDL3 基因多态性与内蒙古地区蒙古族 支气管哮喘的相关性研究

杨 婷 崔丽英

摘 要 **目的** 探讨 ORMDL3 基因多态性与内蒙古地区蒙古族哮喘的相关性。**方法** 选取内蒙古地区蒙古族成人哮喘患者 100 例与蒙古族健康成人 100 例,提取外周静脉血基因组 DNA,利用聚合酶链式反应(PCR)对 SNPs7216389 进行基因扩增,应用基因测序技术检测其 3 种基因型(TT/TC/CC)及等位基因(T/C)的频率分布情况。**结果** 哮喘组的 ORMDL3 基因 rs7216389 位点的基因型分布频率与其对照组相比,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.581, P = 0.023$)。比较两组等位基因分布频率提示 差异有统计学意义($\chi^2 = 9.091, P = 0.003$);比较包括本研究对象在内的不同种族人群间的 rs7216389 - T 等位基因频率分布的差异性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ORMDL3 基因多态性与内蒙古地区蒙古族支气管哮喘的发生有一定相关性,SNPrs7216389 在不同种族的患病人群中的分布有差异有统计学意义。

关键词 ORMDL3 支气管哮喘 rs7216389 蒙古族

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.012

Association Study of ORMDL3 Gene with Mongolian Bronchial Asthma in the Inner Mongolia. Yang Ting, Cui Liying. Respiratory Medicine Department of the Inner Mongolia Medical University Affiliated Hospital, Inner Mongolia 010050, China

Abstract Objective To investigate the role of ORMDL3 genetic variants and asthma in Mongolian cohort of the Inner Mongolia region. **Methods** As the most - correlated locus to asthma susceptibility in the ORMDL3 gene analyses, single nucleotide polymorphism (SNP) rs7216389 was amplified by polymerase chain - reaction (PCR) and its T/C allele frequencies were detected by gene sequencing technology. **Results** We found strongly significant difference of genotype and the variation of allele frequencies in Mongolian patient - control cohorts ($P = 0.023$ and 0.003 , respectively). There was a significant difference for the expression of rs7216389 among diverse ethnical populations ($P = 0.624$ and 0.778 , respectively). **Conclusion** We confirmed the association between asthma risk in the Mongolian asthmatic cohorts and the variant in ORMDL3. The variation of allele frequencies also support the hypothesis that ethnical diversity could predispose to asthma.

Key words ORMDL3 genes; Bronchial asthma; Genetic polymorphism; the Mongolian nationality

支气管哮喘是一种有明显家族聚集倾向的多基因遗传病, Moffatt 等^[1]于 2007 年首次通过全基因组关联性研究(genome - wide association study, GWAS)发现位于 17 号染色体之上的 ORMDL3 (oresomueoid 1 - like protein 3)基因与儿童期哮喘密切相关。其中位于 ORMDL3 附近的 GSDML 基因上的 SNPrs7216389 的与哮喘的相关性研究已在多个种族、地区中广泛开展。近 3 年来我国同类相关研究相继增多,曾在北京儿童、南方成人等不同年龄组,汉族、海南黎族等不同民族,江西省、山东省、深圳市等不同地域利用全基因组关联性研究、PCR 产物酶切

等方法探讨 ORMDL3 基因多态性,尤其是 rs7216389 与哮喘的关系^[2-7]。目前在我国北方少数民族聚集地区,如内蒙古自治区的蒙古族人群中关于 ORMDL3 基因多态性与成人哮喘的关联性研究并不多见。本研究尝试探讨该基因与蒙古族哮喘是否相关。

资料与方法

1. 资料:选择 2011 年 8 月~2013 年 2 月间就诊内蒙古医科大学附属医院呼吸内科,符合 3 代及以上直系亲属均为蒙古族血统的成人哮喘确诊患者 100 例(哮喘组),诊断标准参考中华医学会呼吸病学分会哮喘学组在 2008 年制订的支气管哮喘防治指南^[8],剔除了患有其他慢性呼吸系统疾病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病及其他器质性疾病者。男性 49 例,女性 51 例,患者年龄 16~70 岁,平均年龄 45.00 ± 13.64 岁;对照组:健康蒙古族成人 100 例,其中男性 53 例,女性 47 例,患者年龄 18~67 岁,平均年龄 44.66 ± 12.78 岁。研究对象年龄、性别构成比较差异无统计学意义($P > 0.05$),进行研究前

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2012MS1155)
作者单位:010050 呼和浩特,内蒙古医科大学附属医院呼吸内科
通讯作者:崔丽英,电子信箱:cuiliming306@hotmail.com

均取得受试者知情同意。

2. 研究方法: (1) DNA 提取及检测纯度: 用 EDTA 管抽取外周静脉血 2ml, 利用血液基因组提取试剂盒 (北京天根生物试剂公司) 提取 DNA, 通过紫外分光光度仪 (MJ - Research, Inc, 美国) 检测其纯度。 (2) DNA 扩增: 通过 Primer Premier 软件设计目的 SNPrs7216389 的引物, 序列如下: 上游引物: 5' - TCTCTCGCTGTTGTTTGTAT - 3', 下游引物: 5' - CCCTGTAG-GTTCCCATCT - 3', 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, PCR 扩增反应体系 (50 μ l): 2 $\times$ Taq Master Mix (25 μ l)、ORMDL3 - F (1.0 μ l)、ORMDL3 - R (1.0 μ l)、dNTP (1.0 μ l)、灭菌无离子水 (22 μ l), 扩增产物 443bp, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 循环 25 次, 72 $^{\circ}$ C 过延伸 5min。产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳 (电压 80V/cm, 时间约 60min) 检测见图 1。 (3) 目的基因测序: 委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 应用 DNAMAN 软件、

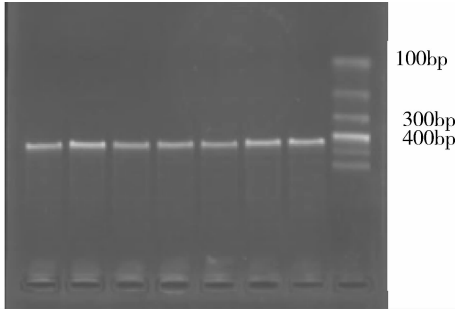


图 1rs7216389PCR 产物凝胶电泳图

DNASTAR 软件分析测序文本, 得到 SNP 位点 3 种基因型的分布频率, 应用 Chromas 软件分析测序波峰图谱, 观察 SNP 位点的杂合情况, 见图 2。

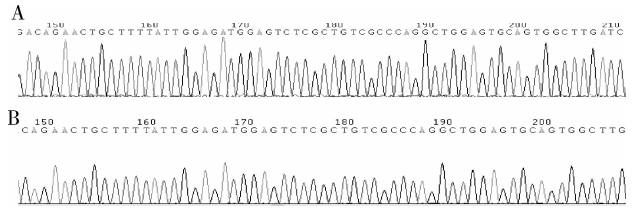


图 2 SNP 位点波峰图

A. 1 例健康蒙古族成人 SNP 位点波峰图; B. 1 例蒙古族哮喘患者 SNP 位点波峰图

3. 统计学方法: 综合整理所有实验数据后利用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 病例组与对照组的等位基因及基因型频率的差异性分析采用 χ^2 检验, 多样本间率的比较采用 χ^2 检验, 采用 Logistic 回归进行相关性检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

哮喘组对照组 rs7216389 位点的基因型 (TT/TC/CC) 分别为 (43%/39%/18%) 与 (28%/39%/33%), 等位基因频率 (T/C) 分别为 (62.5%/37.5%) 与 (47.5%/52.5%)。运用 χ^2 检验, 两组间基因型频率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 等位基因频率比较亦差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 1。

表 1 两组间 rs7216389 位点基因型及等位基因的分布频率比较 [n(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		TT	TC	CC	T	C
哮喘组	100	43 (43.0)	39 (39.0)	18 (18.0)	125 (62.5)	75 (37.5)
对照组	100	28 (28.0)	39 (39.0)	33 (33.0)	95 (47.5)	105 (52.5)
χ^2			7.581			9.091
P			0.023			0.003

采用 Logistic 回归模型比较两组间 rs7216389 位点不同基因型的致病风险, 相对于基因型 CC, 基因

型 TT 与 TT + TC 均能增加哮喘发生率, 而基因型 TC 可能与哮喘发生无关, 详见表 2。

表 2 两组间 rs7216389 位点不同基因型的相对危险度的比较

组别	n	基因型			CC
		TT	TT + TC	TC	
哮喘组	100	43	82	39	18
对照组	100	28	67	39	33
OR 值 (95% CI)		0.355 (0.168 ~ 0.749)	0.446 (0.231 ~ 0.861)	0.545 (0.264 ~ 1.127)	1.000
P		0.007	0.016	0.102	0.000

针对 ORMDL3 基因的表达可能存在种族、地域差异性, 采用 χ^2 检验对近几年国内外多篇文献报道所提出的关于 rs7216389 位点等位基因 T、C 的不同

的分布频率之间进行比较 ($P < 0.05$), 提示 ORMDL3 基因 rs7216389 位点可能存在显著的种族差异, 详见表 3。

表3 多种族、地域的哮喘人群间的 rs7216389 位点等位基因频率比较

等位基因	等位基因频率					
	波多黎各	德国	澳大利亚	墨西哥	日本	中国内蒙古自治区蒙古族
T	63.100	47.300	53.000	70.100	78.200	62.500
C	36.900	52.700	47.000	29.900	21.800	37.500

$$\chi^2 = 29.195, P = 0.000$$

讨 论

ORMDL3 基因包括 6560 个碱基对,包含 3 个外显子,编码位于内质网上的由 153 个氨基酸组成的 4 种跨膜蛋白,其序列高度保守,其表达产物在各组织中广泛分布,尤其在成人肝脏、胰腺中,在胎儿的肺、肝脏、肾脏、脾脏中呈高水平表达,但具体功能目前还不明确^[9,10]。近年来有研究推测该基因产物可能与蛋白质折叠有关^[11]。ORMDL3 蛋白的表达异常以致未折叠蛋白反应(URP)而促进炎症反应、致脂质代谢紊乱而影响细胞功能及参与、影响呼吸道病毒感染等方式致病^[1,9,11]。

rs7216389 及其周围基因为跨种族的高度保守的非编码区序列,与促炎性转录因子 C/EBP β 具有高度同源性^[12]。有研究表明 T 等位基因可显著增加波多黎各、日本、法籍加拿大、欧洲及墨西哥哮喘人群的患病风险,但是在非裔美洲人中未证实这一点^[10]。Tavendale 等^[13]在苏格兰青年(≤ 22 岁)人群中发现 rs7216389 - T 与哮喘正相关, T 等位基因分布频率越高,发生率越高。Bisgaard 等^[14]在北欧地区发现 rs7216389 - T 与早期哮喘有关。Wu 等^[15]在墨西哥人群(4 ~ 17 岁)中发现 rs7216389 - T 能够显著增加哮喘的发病风险。在我国南方地区、汉族及海南黎族的哮喘人群(包括成人及儿童)中,rs7216389 的基因分布频率也有显著差异^[3,5]。孙婧等^[16]将北京儿童哮喘病的严重程度分型后探究与 ORMDL3 基因的关联性,发现 rs7216389 位点与哮喘的严重程度密切相关,其中,T 等位基因的携带者发生重度哮喘的风险更大,这一结论在英国地区也得到证实,即 rs7216389 易于诱发儿童发生重度哮喘^[17]。

池颖静等^[3]针对南方成人哮喘患者起病年龄的不同分组研究发现,早发与晚发组在 ORMDL3 的基因多态性分布上无明显差异,从而得出尽管成年患者的起病存在环境因素的影响,rs7216389 - T 仍可提高哮喘易感性的结论。此外,崔云霞等^[18]通过检索和荟萃分析的方法分析了 6 篇代表性良好的中外相关文献,进一步证明了 rs7216389 的多态性与儿童哮喘密切相关。综上所述,各种族、地域的哮喘人群中采

用不同的研究方法说明 rs7216389 与哮喘的相关性研究重复性较好,但是由于各人群遗传背景不同、入选病例哮喘分型不同、SNP 间存在连锁失衡的现象、环境因素及生活方式的影响、检测方法各异等原因,致使如上结论还需要更多重复性验证。

本研究将哮喘患者中该位点基因型(TT/TC/CC)的分布频率、等位基因的分布频率分别与对照组比较,差异有统计学意义,说明 rs7216389 与哮喘发病相关。相对于基因型 CC,基因型 TT(OR = 0.335, $P = 0.007$)与基因型 TT + TC(OR = 0.446, $P = 0.016$)均能显著增加哮喘易感性,而基因型 TC(OR = 0.545, $P = 0.102$)则可能与哮喘无关。

综上所述,通过本研究可以发现携带 T 等位基因的纯合子 TT 可能提高哮喘发生率,而同为携带 T 等位基因的杂合体 TC 及携带 C 等位基因的纯合子 CC 可能与哮喘无关,甚至发挥负效应。笔者发现对照组的 C 等位基因频率(52.5%)高于哮喘组(37.5%),据此可以推测 T 等位基因可能是哮喘的易感基因,而 C 等位基因可能是保护基因,这一结论与 Moffatt、Wu 等^[15]、Tavendale 等^[13]、Bisgaard 等^[14]及黄汉琮^[6]、池颖静等^[3]的发现是一致的。故 rs7216389 及其相邻基因可以作为重要的遗传标记,预测哮喘的发病可能,为该病的早期诊断提供分子遗传学依据。

为了进一步明确 SNPrs7216389 的等位基因 T、C 在多种族人群中的分布频率有无差异,本研究采用 χ^2 检验比较了包括我国内蒙古自治区蒙古族在内的亚、欧、美洲人种(波多黎各、德国、澳大利亚、墨西哥、日本)间的 T、C 等位基因频率分布,差异有统计学意义($P < 0.05$),这一结论与 Glanter 等关于 rs7216389 - T 与多种族人群的哮喘相关性差异有统计学意义的结论是一致的。

参考文献

- Moffatt MF, Kabesch M. Genetic variants regulating asthma - associated ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. Nature, 2007, 448(7152): 470 - 473
- 金哲, 蔡欣, 王强, 等. 北京地区哮喘儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式与室内空气质量的相关性研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 22 - 25

(下转第 52 页)

下, DC 表面免疫分子的表达, 促进同种异体细胞增殖的能力及自发 IL-12 分泌水平与空白对照组并无明显差异。然而, HBeAg 却可抑制 LPS 引起的 DC 表面 MHC-II 和 CD86 的表达, 降低 LPS 诱导增强的促同种异体淋巴细胞增殖能力, 说明 HBeAg 有一定抑制树突状细胞成熟并影响其功能的作用。

在治疗 HBeAg 阳性的 CHB 患者时, 实现 HBeAg 血清学转换是重要的目标。临床数据显示, IL-12 的峰值出现在 HBeAg 血清学转换前及转换过程中, 且较高的 IL-12 水平与早期自发 HBeAg 血清学转换有关。DC 是机体内 IL-12 的重要来源, IL-12 是一种重要的 Th1 型免疫应答诱导因子。本研究发现 HBeAg 对 LPS 诱导的 DC 的 IL-12 分泌有明显下调作用, 推断 HBeAg 可通过影响 DC IL-12 的分泌, 导致 T 淋巴细胞免疫应答无法有效激活, 这可能也是导致 HBV 感染慢性化的机制之一。

病毒和机体的相互作用是多方面的。以往关于 CHB 的研究多着眼于效应 T 淋巴细胞, 对抗原递呈细胞的研究相对较少, 而仅仅针对一种免疫细胞的功能研究无法确切地揭示免疫状态与 CHB 的关系。本研究结果提示 HBeAg 对树突状细胞并无明显细胞毒性作用, 可能通过抑制树突状细胞的生成和活化, 使其无法发挥正常功能, 进而影响机体对抗原的识别及递呈功能, 最终导致机体特异性免疫应答无法正常启动, 这极可能与 HBV 持续感染有关。但是有关

HBeAg 干扰 DC 的确切机制仍有待于进一步研究, 并且课题组也将在今后的临床研究中探讨慢性乙肝患者 HBeAg 水平与机体 DC 数量和功能的关系。

参考文献

- EASL - EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2012, 56(4): 908 - 943
- Zheng BJ, Zhou J, Qu D, *et al.* Selective functional deficit in dendritic cell - T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection [J]. J Viral Hepat, 2004, 11(3): 217 - 224
- Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection [J]. Hepatology, 2003, 38(5): 1075 - 1086
- van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, *et al.* Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2004, 40(3): 738 - 746
- 韩亚萍, 李军, 蒋龙凤, 等. HBeAg 导致慢性乙型肝炎患者外周血 Th1/Th2 型细胞因子失衡 [J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(8): 584 - 589
- Adema GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back [J]. Immunol Lett, 2009, 122(2): 128 - 130
- Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.* Immunobiology of dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 767 - 811
- Ouaaz F, Arron J, Zheng Y, *et al.* Dendritic cell development and survival require distinct NF - kappaB subunits [J]. Immunity, 2002, 16(2): 257 - 270
- van de Laar L, van den Bosch A, van der Kooij SW, *et al.* A nonredundant role for canonical NF - kappaB in human myeloid dendritic cell development and function [J]. J Immunol, 2010, 185(12): 7252 - 7261
- Lang T, Lo C, Skinner N, *et al.* The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll - like receptor signaling pathway [J]. Journal of Hepatology, 2011, 55(4): 762 - 769
(收稿日期: 2014 - 11 - 21)
(修回日期: 2014 - 12 - 29)
- Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, *et al.* Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis [J]. Nature, 2010 463(7284): 1048 - 1053
- Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay S, *et al.* A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications [J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(4): 860 - 863
- Bisgard H, Bonnelykke K, Sleiman PM, *et al.* Chromosome17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(3): 179 - 185
- Wu H, Romieu I, Sienna - Monge JJ, *et al.* Genetic variation in ORM1 - like3 (ORMDL3) and gasdermin - like (GSDML) and childhood asthma [J]. Allergy, 2009 64(4): 629 - 635
- 孙婧, 李乔俊, 徐飞, 等. 儿童哮喘与 ORMDL3 基因多态性关系的研究 [J]. 中国康复理论实践, 2010, 16(4): 361 - 363
- Binia A, Khorasani N, Bhavsar PK, *et al.* Chromosome 17q21 SNP and Severe Asthma [J]. J Hum Genet, 2011, 56(1): 97 - 98
- 崔云霞, 张慧妹, 师岩, 等. ORMDL3 基因 SNP 位点 rs7216389 多态性与儿童哮喘易感性关系的荟萃分析 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2012, 46(6): 530 - 533
(收稿日期: 2014 - 10 - 19)
(修回日期: 2014 - 11 - 13)

(上接第 40 页)

- 池颖静, 庄建伟, 江柳. ORMDL3 基因多态性与南方成人哮喘发生的相关研究 [J]. 中国医学创新, 2012, 9(30): 1 - 3
- 邱榕芳, 高贵敏, 郭辰虹, 等. ORMDL3 基因与汉族人群哮喘的相关性研究 [J]. 国际遗传学杂志, 2009, 32(4): 13 - 16
- 丁毅鹏, 何海武, 石慧芳, 等. 海南黎族哮喘 ORMDL3 基因多态性研究 [J]. 海南医学, 2012, 23(11): 1 - 2
- 黄汉琼, 曾林祥. ORMDL3 基因多态性与支气管哮喘发病及肺功能的相关性研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(10): 780 - 781
- 卢爱萍, 林岳华, 张苏皖等. ORMDL3 基因多态性在哮喘高危患儿中的研究 [J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2111 - 2113
- 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3): 177 - 185
- Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, *et al.* ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins [J]. Genome Biol, 2002, 3(6): 1 - 16
- Gerard CR, Fandos C, Fanny RM, *et al.* The asthma - associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum - mediated calcium signaling and cellular stress [J]. Human Molecular Genetics, 2010, 19(1): 111 - 121
- Hsu KJ, Turvey SE. Functional analysis of the impact of ORMDL3 expression on inflammation and activation of the unfolded protein response in human airway epithelial cells [J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2013, 9(1): 4