

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.03.08

· 临床研究 ·

哮喘患者 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 C/T、 $\beta 2$ -AR 基因 R16G 单核苷酸多态性及 *HLA* 等位基因频率表达对外周血 T 淋巴细胞亚群和 IgE 的影响*

常永莉, 张莉媛, 王惠琴, 王冰, 陈方园, 李天浩(陕西中医药大学第二附属医院呼吸内科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探究白细胞介素-13(interleukin-13, *IL-13*) 基因、 $\beta 2$ 肾上腺素能受体($\beta 2$ adrenergic receptor, $\beta 2$ -AR) 基因、人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, *HLA*) 基因对哮喘患者外周血 T 淋巴细胞亚群和血清 IgE 的影响。方法 收集 2019 年 1 月至 2020 年 1 月就诊的 90 例哮喘患者作为疾病组, 另收集同期体检的 90 例健康志愿者作为健康人对照组, 使用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP) 检测 2 组 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 C/T 多态性、 $\beta 2$ -AR 基因 R16G 单核苷酸多态性及 *HLA* 等位基因频率; 采用流式细胞术测定 2 组 T 淋巴细胞亚群的表达水平, ELISA 法检测血清 IgE 的表达水平。结果 疾病组和健康人对照组 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点中 TT(15.56% vs 0%, $\chi^2=16.873, P=0.000$)、TC(43.33% vs 27.78%, $\chi^2=5.276, P=0.022$)、CC(41.11% vs 72.22%, $\chi^2=19.707, P=0.000$) 基因型频率的差异有统计学意义; 此外, 与健康人对照组比较, 疾病组 $\beta 2$ -AR 基因 R16G 多态性中 AA 型频率(47.78% vs 21.11%, $\chi^2=15.750, P=0.000$)、*HLA* 0401 型(13.33% vs 0%, $\chi^2=14.282, P=0.000$)、0601 型(12.22% vs 0%, $\chi^2=13.015, P=0.000$) 频率均明显升高。*IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 TT 及 TC 型 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 表达水平较 CC 型明显降低(P 均 <0.01), 而 IgE 表达水平(P 均 <0.01) 明显升高。 $\beta 2$ -AR 基因 R16G 位点 AA 型 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 表达水平较 GG、AG 型明显降低(P 均 <0.01), 而 IgE 表达水平明显升高(P 均 <0.01)。*HLA* 基因 0401 及 0601 型较 0101/0102、0103、0501 型明显降低(P 均 <0.01), 而 IgE 水平明显升高(P 均 <0.01)。结论 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 C/T、 $\beta 2$ -AR 基因 R16G 位点 AA、*HLA* 基因 0401 及 0601 型突变等位基因频率在哮喘患者中的表达水平存在显著差异, 可能是哮喘发病的危险因素。

关键词: 白细胞介素-13; $\beta 2$ 肾上腺素能受体; 人类白细胞抗原; 哮喘; T 淋巴细胞亚群; 血清 IgE

中图分类号: R446

文献标志码: A

细胞因子可调节细胞增殖、分化, 其中白细胞介素-13(interleukin-13, *IL-13*) 基因、 $\beta 2$ 肾上腺素能受体($\beta 2$ adrenergic receptor, $\beta 2$ -AR) 基因、人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, *HLA*) 基因在哮喘患者发病过程中具有重要意义^[1]。*IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 C/T 多态性对 *IL-13* 的生物学活性具有调节作用^[2]。Mohamed-Hussein 等^[3]指出, $\beta 2$ -AR 功能低下可能是导致哮喘发病的重要机制。谷亚星等^[4]认为, *HLA* 基因在调节机体免疫方面具有重要作用, 且对多种呼吸系统疾病具有易感性。因此, 对上述基因多态性的研究已成为了哮喘遗传学的研究热点。本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-PFLP) 对 90 例哮喘患者 *IL-13*、 $\beta 2$ -AR 及 *HLA* 基因进行检测, 并测定其与 T 淋巴细胞亚群及免疫球蛋白 E(IgE) 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2019 年 1 月至 2020 年 1 月陕西中医药大学第二附属医院呼吸内科收治的 90 例哮喘患者资料作为疾病组, 男 62 例, 女 28 例, 年龄(32.4 ± 3.9) 岁, 病程(2.1 ± 1.3) 年; 其中 58 例有吸烟史; 轻度哮喘 17 例, 中度哮喘 47 例, 重度哮喘 36 例。诊断依据中华医学会呼吸病学学会制定的《支气管哮喘诊断标准》^[5], 纳入标准: (1) 反复发作呼吸困难、喘息、咳嗽、胸闷; (2) 发作时双肺可闻及散在弥漫性、以呼气相为主的哮鸣音, 呼气相延长; (3) 上述症状治疗后可自行缓解或缓解, 且患者无其他引起喘息、胸闷、咳嗽的疾病。具备以上任何 1 条可纳入疾病组。排除标准: 对患严重肺、肝、肾疾病, 血液系统疾病, 恶性肿瘤, 自身免疫病以及近期有手术、外伤及严重感染的患者予以排除。收

* 基金项目: 陕西中医药大学第二附属医院学科创新团队(2020XKTD-C04)。

作者简介: 常永莉, 1978 年生, 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向: 呼吸疾病的诊治。

通信作者: 张莉媛, 主治医师, E-mail: 491880361@qq.com。

集同期体检的 90 例健康志愿者作为健康人对照组。男 60 例,女 30 例,年龄(33.0±3.0)岁;其中 50 例有吸烟史。2 组性别、年龄、吸烟史等一般资料相比,差异均无统计学意义($\chi^2_{\text{性别}} = 0.113, P = 0.737; t_{\text{年龄}} = 1.249, P = 0.213; \chi^2_{\text{吸烟史}} = 1.643, P = 0.200$)。本研究经陕西中医药大学第二附属医院医学伦理委员会批准(批准文号:LW2021002),所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 限制性内切酶 NIA IV、TaqDNA 聚合酶、IgE 酶标抗体、Trizol 试剂(美国赛默飞世尔科技公司),抗人 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 单克隆抗体及 IgG 对照(北京同立海源生物科技有限公司)。Applied biosystems PCR 热循环仪(美国赛默飞世尔科技公司),DNM-9602G 酶联仪(北京普朗新技术公司),DYY-4C 稳压稳压流时电泳仪(上海沪粤明科学仪器有限公司),BD 流式细胞仪(昆山市赛特科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及 DNA 抽提 采集哮喘患者治疗前及健康人对照组体检时的晨起空腹静脉血 3 mL,477×g 离心 10 min。取血浆 500 μL,置于-20 °C 保存,用以检测血清 IgE 水平。其余部分抽提 DNA。吸取细胞悬液至 1.5 mL Ep 管中,4 °C、251×g 离心

5 min,弃上清液,按照 Trizol 试剂说明书操作抽提 DNA,采用紫外分光光度计检测 DNA 样本,取吸光度($A_{260/280 \text{ nm}}$)值在 1.8~2.1 的样本用于后续试验。样本置-20 °C 保存。

1.3.2 引物设计及 PCR 根据 GenBank 收录的 *IL-13*、*β2-AR*、*HLA* 基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,并由上海生工公司合成特异性引物,引物序列见表 1。PCR 扩增总体系为 50 μL,包括基因组 DNA 200 ng,10×PCR buffer 5 μL,dNTPs 各 10 nmol,1.5 U Taq DNA 聚合酶,10 pmol 上、下游引物,具体扩增所需 MgCl₂ 浓度(*IL-13* 和 *β2-AR* R16G A/G 均为 1.5 μL,*HLA* 为 2.0 μL),使用灭菌蒸馏水补充体积至 50 μL。*IL-13* 基因 PCR 循环参数:94 °C 变性 2 min;94 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 50 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。*β2-AR* R16G A/G 基因 PCR 循环参数:95 °C 变性 5 min;95 °C 30 s,66 °C 45 s,72 °C 60 s,共 40 个循环;72 °C 10 min。*HLA* 基因 PCR 循环参数:94 °C 变性 5 min;55 °C 60 s,72 °C 60 s,共 35 个循环;72 °C 10 min。取 3 μL PCR 扩增产物,采用 Applied biosystems PCR 热循环仪检测(220 V 电压,电泳 20 min),30 g/L 琼脂糖凝胶电泳并观察。

表 1 PCR 引物序列及产物片段大小

基因	GenBank 序列号	引物序列(5'→3')	产物片段大小(bp)
<i>IL-13</i>	U31120.1	F:GGACAGGGACCCACTTCACAC R:GCTAACATATTTAATAATTTATGTAC	559
<i>β2-AR</i> R16G A/G	MT627195.1	F:GCCTTCTTGCTGGCACCCCAT R:CAGACGCTCGAACTTGCCCATG	168
<i>HLA</i>	J00191.1	F:ATGGTCTAAACTTGAACCACT R:CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG	242

1.3.3 PCR-PFLP 取 PCR 产物 10 μL,37 °C 酶切过夜。在 30 g/L 琼脂糖凝胶中加溴化乙锭(0.7 mg/L),取 8 μL 酶切产物上样电泳凝胶,紫外分光光度计下观察。*IL-13* 基因型 CC 位点存在 *Bsa*AI 位点,酶切产物为 310 bp、249 bp,CT 基因型出现酶切点,酶切产物为 559 bp、310 bp、249 bp,而 TT 基因未出现酶切点。*β2-AR* R16G 基因酶切后 A/A 基因型为 168 bp,G/G 基因型为 150 bp + 18 bp,A/G 杂合子基因型为 168 bp + 150 bp + 18 bp。

1.3.4 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群 取各组患者静脉血 3 mL,经 EDTA-K₂ 抗凝后,取 100 μL 加入试管,依次加入抗人 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 单克隆抗体 20 μL,取另一管加入 MsIgG1-RD1/MsIgG2-

FITC 各 20 μL 作为阴性对照管,避光静置 30 min。加入 0.2 mL 溶血剂后进行 10 倍稀释,静置 5 min,240×g 离心 5 min 后弃上清液。加入 2 mL PBS 洗涤 2 次,240×g 离心 5 min。加入 1% 多聚甲醛 0.3 mL,采用 BD 流式细胞仪检测。以 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 阳性率 ≥ 0.1% 为阳性表达。

1.3.5 ELISA 法检测血清 IgE 取上述 2 组患者的血清样本,复温后按照 ELISA 试剂盒及 DNM-9602G 酶联仪说明书操作检测 IgE 水平。IgE 参考范围 < 85 KU/L。

1.4 统计学分析 采用统计学软件 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析。对数据进行正态性和方差齐性分析,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,组间两

两比较用 SNK-*q* 检验或 LSD-*t* 检验,率的比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *IL-13*、 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因频率在 2 组中的分布
疾病组患者 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 TT、TC 基因型频率、 $\beta 2$ -*AR* R16G 基因位点 AA 基因型频率、*HLA* 基因 0401、0601 等位基因频率较健康人对照组均显著升高 ($P < 0.05$)。而 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点 CC 基因型频率较健康人对照组显著降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 *IL-13*、 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 不同基因型对 T 淋巴细胞亚群及血清 IgE 水平的影响
IL-13 TT、TC、 $\beta 2$ -*AR* AA、*HLA* 0401、0601 基因型患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 较 *IL-13* CC、 $\beta 2$ -*AR* GG、AG、*HLA* 0101/

0102、0103、0501 基因型患者显著降低,而血清 IgE 水平较 *IL-13* CC、GG、 $\beta 2$ -*AR* AG、*HLA* 0101/0102、0103、0501 基因型显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 2 组 *IL-13*、 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因不同基因型频率 [n(%)]

基因	疾病组	健康人对照组	χ^2	<i>P</i> 值
<i>IL-13</i>	CC	37(41.11)	65(72.22)	19.707 0.000
	TT	14(15.56)	0	16.873 0.000
	TC	39(43.33)	25(27.78)	5.276 0.022
$\beta 2$ - <i>AR</i>	AA	43(47.78)	19(21.11)	15.750 0.000
	GG	21(23.33)	17(18.89)	0.592 0.442
	AG	43(47.78)	38(42.22)	0.625 0.429
<i>HLA</i>	0101/0102	19(21.11)	24(26.67)	0.850 0.357
	0103	13(14.44)	16(17.78)	0.413 0.521
	0401	12(13.33)	0	14.282 0.000
	0601	11(12.22)	0	13.015 0.000
	0501	15(16.67)	16(17.78)	0.043 0.835

表 3 *IL-13* 基因不同基因型患者 T 淋巴细胞及 IgE 的水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	基因型	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)	IgE(KU/L)
<i>IL-13</i>	CC	59.26±3.28*	33.27±2.14*	1.27±0.24*	57.34±13.24*
	TT	57.06±3.27	27.36±2.37	1.15±0.24	92.34±13.02
	TC	56.97±3.18	27.29±1.98	1.16±0.25	88.35±12.28
	<i>F</i> 值	14.388	165.416	6.736	199.982
	<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.001	0.000
	$\beta 2$ - <i>AR</i>	AA	56.80±2.99	28.01±2.41	1.15±0.26
GG		60.15±2.83 [#]	33.62±2.16 [#]	1.29±0.27 [#]	58.27±12.15 [#]
AG		60.11±2.91 [#]	33.12±2.15 [#]	1.29±0.26 [#]	59.26±11.25 [#]
<i>F</i> 值		39.269	172.397	8.477	131.112
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000
<i>HLA</i>		0101/0102	59.26±2.83 Δ	33.25±2.12 Δ	1.28±0.22 Δ
	0103	59.27±2.88 Δ	33.83±1.44 Δ	1.30±0.23 Δ	61.28±12.95 Δ
	0401	56.63±2.73	27.82±2.31	1.16±0.26	89.27±14.21
	0601	57.01±3.27	27.51±2.24	1.15±0.25	85.37±13.20
	0501	60.01±4.01 Δ	34.25±2.21 Δ	1.29±0.28 Δ	61.26±13.24 Δ
	<i>F</i> 值	27.044	256.539	7.899	112.697
	<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.001	0.000

注:与 TT 型比较,*, $P < 0.05$;与 AA 型相比,#, $P < 0.05$;与 0401 型、0601 型比较, Δ , $P < 0.05$ 。

3 讨论

既往的研究仅针对单一基因位点进行相关性分析,对多个基因位点研究报道较少,考虑到 *IL-13*、 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因多态性在哮喘患者进展过程中具有重要的临床意义,本研究使用 PCR-PFLP 法进行基因多态性分析,并对其与患者 T 淋巴细胞亚群及 IgE 水平关系进行探讨。

本研究结果显示,哮喘患者 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点共出现 CC、TT、TC 3 种基因型,其中患者 TT、TC 基因型频率显著高于健康人对照组 ($P < 0.05$),表明哮喘患者 T 等位基因频率分布高于健康人对照组,C 等位基因显著低于健康人对照组,

提示 *IL-13* 基因 Intron3+1923 位点上的 T 等位基因可能是哮喘的易感基因,而 C 等位基因可能是哮喘患者的抵抗基因。因此,具有 T 等位基因的人群可能因为长期生活在污染严重或过敏原较多的环境中,哮喘发病率明显增加^[6]。此外, $\beta 2$ -*AR* R16G 单核苷酸多态性(SNP)共出现 AA、GG、AG 3 种基因型,AA 基因型频率高于健康人对照组 ($P < 0.05$)。AA 属纯合子基因型,提示纯合子基因型与哮喘发作有一定关联。刘晓华等^[7]研究证实, $\beta 2$ -*AR* R16G 中 AA 基因型与哮喘具有一定相关性,急性期和缓解期 $\beta 2$ -*AR* R16G 16 位点的分布基因频率中精氨酸/精氨酸分别为 17.7% 和 23.5%,精氨酸/甘氨酸为 67.7% 和 66.2%,甘氨酸/甘氨酸为 14.5% 和

10.3%, 27 位点分布基因频率中谷氨酰胺/谷氨酰胺为 80.6% 和 75.0%, 谷氨酰胺/谷氨酸为 12.9% 和 17.6%, 谷氨酸/谷氨酸为 6.5% 和 7.4%, 二者在 2 个位点上基因型存在差异, 与本研究结果相一致。*HLA* 等位基因共出现 0101/0102、0103、0401、0601、0501 基因型, *HLA* 0401、0601 基因型频率均高于健康人对照组 ($P < 0.05$), 提示 0401、0601 基因型可对哮喘产生影响。有学者证实, *IL-13* 水平过高可诱导患者体内 B 细胞合成 IgE, 导致患者出现免疫功能紊乱, 出现 T 淋巴细胞亚群失衡^[8]。本研究中 TT、TC、AA、0401、0601 型患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平均低于其余基因型患者, 而血清 IgE 水平高于其余基因型患者, 提示 *IL-13* 基因携带 T 基因型、 $\beta 2$ -*AR* 基因 AA 纯合子基因型、*HLA* 0401、0601 等位基因可能具有协同作用。

通过研究 *IL-13*、 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因位点突变导致哮喘进展, 引起 T 淋巴细胞亚群、IgE 表达失衡, 笔者认为 *IL-13*、 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因表达水平异常及基因多态性可导致机体出现 T_H1/T_H2 失衡, *IL-13* 表达水平增加, 大量作用于 B 细胞, 从而加重体内炎症反应。Reich 等^[9]指出, IgE 可调节严重特异性皮炎患者皮肤组织中 *IL-13* 的表达, 与本研究结果相一致。同时, *IL-13* 基因可直接促进 IgE 细胞因子合成, $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因可转导相似信号^[10]。虽然 $\beta 2$ -*AR*、*HLA* 基因与 *IL-13* 之间的作用机理目前尚不清楚, 但 *IL-13* 可诱导 MHC II 类分子及 CD23 表达, 抑制嗜酸性粒细胞凋亡, 诱导 $\beta 2$ -*AR* 及 *HLA*-DR 表达, 促进 T 细胞活化。本研究仅证实 *IL-13* 基因携带 T 基因型、 $\beta 2$ -*AR* 基因 AA 纯合子基因型、*HLA* 0401、0601 等位基因与哮喘患者存在一定关系, 但在地域、人种之间的区别及如何形成遗传易感性机制, 还需进一步研究。本研究今后将增加样本量, 并对患者病情严重程度及家族史进行分

析, 从而为预防、诊治哮喘提供实验依据。

4 参考文献

- [1] Bai Y, Zhou QY, Fang Q, et al. Inflammatory cytokines and T-lymphocyte subsets in serum and sputum in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:2206-2210.
- [2] Oishi K, Matsunaga K. Three-step algorithm for biological therapy targeted IgE and IL-5 in severe asthma[J]. Immun Inflamm Dis, 2018, 6(3):374-376.
- [3] Mohamed-Hussein AAR, Sayed SS, Eldien HMS, et al. Beta 2 adrenergic receptor genetic polymorphisms in bronchial asthma: relationship to disease risk, severity, and treatment response[J]. Lung, 2018, 196(6):673-680.
- [4] 谷亚星, 侯沛君, 王金荣, 等. *ORMDL3* 和 *HLA-DQ* 基因多态性及交互作用在儿童肺炎支原体感染相关哮喘中的研究[J]. 国际儿科学杂志, 2018, 45(6):451-455.
- [5] 中华医学会呼吸病学会. 支气管哮喘诊断标准[J]. 新医学, 2003, 34(2):66.
- [6] Hammad Mahmoud Hammad R, Hamed DHED, Eldosoky MAER, et al. Plasma microRNA-21, microRNA-146a and IL-13 expression in asthmatic children[J]. Innate Immun, 2018, 24(3):171-179.
- [7] 刘晓华, 李大文, 伊志刚. 研究支气管哮喘分期与 $\beta 2$ -*AR* 基因多态性的关系[J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(2):217.
- [8] Zhang JH, Zhang M, Wang YN, et al. Correlation between *IL-4* and *IL-13* gene polymorphisms and asthma in Uygur children in Xinjiang[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(2):1374-1382.
- [9] Reich K, Hartjen A, Reich J, et al. Immunoglobulin E-selective immunoadsorption reduces peripheral and skin-bound immunoglobulin E and modulates cutaneous IL-13 expression in severe atopic dermatitis[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(3):720-723.
- [10] Alves CC, Arruda LKP, Oliveira FR, et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with asthma severity[J]. Mol Immunol, 2018, 101:500-506.

(收稿日期:2020-09-03)

(本文编辑:许晓蒙)