

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170964

血清类黏蛋白1样蛋白3基因单核苷酸多态性与儿童肺炎支原体感染相关哮喘的相关性

裴学芹¹, 毕玉娜², 谷亚星³, 王金荣^{3*}

1. 山东省妇幼保健院小儿呼吸科, 济南 250014

2. 山东省立第三医院小儿呼吸科, 济南 250031

3. 山东大学附属省立医院儿科呼吸综合科, 济南 250021

[摘要] 目的:探讨血清类黏蛋白1样蛋白3(orosomucoid 1-like protein 3,ORMDL3)基因单核苷酸多态性与儿童支原体肺炎(mycoplasma pneumoniae,MP)所致哮喘的相关性。方法:选取2015年1月至12月在山东大学附属省立医院儿科接受诊治的200例3~12岁MP住院患儿为研究对象,随访观察1年以上,分为MP哮喘组和MP非哮喘组。选取哮喘易感基因ORMDL3的2个位点rs4794820和rs7216389,对各组患儿的基因型分布进行分析。结果:失访6例,最后纳入194例MP感染患儿,其中男性为女性的2.3倍。MP发展为哮喘的患儿占32.5%(63/194),MP哮喘组和MP非哮喘组的年龄构成分布差异无统计学意义。两组患儿的ORMDL3基因rs4794820、rs7216389位点基因型及等位基因分布差异均有统计学意义($P<0.05$),其中rs4794820位点GG基因型和rs7216389位点TT基因型均是患儿发生哮喘的危险因素($OR=2.036, 95\%CI 1.104\sim3.754, \chi^2=5.258, P=0.022$; $OR=2.274, 95\%CI 1.221\sim4.236, \chi^2=6.841, P=0.009$)。MP哮喘组患儿血清IgE升高比例明显高于MP非哮喘组($P<0.05$)。结论:ORMDL3基因多态性与儿童MP相关哮喘相关,rs4794820位点GG基因型、rs7216389位点TT基因型及血清IgE水平升高均是儿童MP进展为哮喘的危险因素。

[关键词] 哮喘;支原体感染;单核苷酸多态性;ORMDL3基因**[中图分类号]** R 562.2⁺5**[文献标志码]** A

Correlation between single nucleotide polymorphisms of ORMDL3 gene and mycoplasma pneumoniae-associated asthma in children

XI Xue-qin¹, BI Yu-na², GU Ya-xing³, WANG Jin-rong^{3*}

1. Department of Pediatric Respiratory, Shandong Maternity and Child Health Care Hospital, Ji'nan 250014, Shandong, China

2. Department of Pediatric Respiratory, Shandong Provincial Third Hospital, Ji'nan 250031, Shandong, China

3. Department of Respiratory Comprehensive Pediatrics, Provincial Hospital, Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong, China

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of orosomucoid 1-like protein 3 (ORMDL3) gene and asthma induced by mycoplasma pneumoniae(MP) in children. **Methods:** Two hundred patients aged 3-12 years with MP were enrolled in this study. The children were followed up for more than 1 year, then classified into asthmatic group and non-asthmatic group. The genotype distributions of ORMDL3 gene at rs4794820 and rs7216389 loci in the two groups of children were analyzed. **Results:** Because of 6 cases were lost in follow-up, 194 cases with MP infection were finally enrolled in this study, in which the males were about 2.3 times as much as the females. About 32.5% (63/194) children with asthma caused by MP. There was no significant difference in age distribution between asthmatic group and non-asthmatic group. There were significant differences in genotype and allele frequency of ORMDL3 rs4794820 and rs7216389 loci between asthmatic group and non-asthmatic group ($P<0.05$), respectively. The rs4794820 GG genotype and rs7216389 TT genotype of ORMDL3 gene were the risk factors for children with asthma ($OR=2.036, 95\%CI 1.104\sim3.754, \chi^2=5.258, P=0.022$; $OR=2.274, 95\%CI 1.221\sim4.236, \chi^2=6.841, P=0.009$). In addition, the proportion of serum IgE elevated in asthmatic group was higher than that in non-asthmatic group ($P<0.05$). **Conclusions:** The SNPs of ORMDL3 gene

[收稿日期] 2017-11-10**[接受日期]** 2017-12-16**[基金项目]** 山东省科技发展计划(2015GGB14125). Supported by Plan of Science and Technology Development of Shandong Province (2015GGB14125).**[作者简介]** 裴学芹, 硕士, 副主任医师. E-mail: xixueqin88@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0531-87938911; E-mail: jrwang60@163.com

is associated with MP-associated asthma in children, and rs4794820 GG genotype and rs7216389 TT genotype as well as the elevated serum IgE level are the risk factors for asthma caused by MP in children.

[Key Words] asthma; mycoplasma infections; single nucleotide polymorphisms; ORMDL3 gene

支气管哮喘是一种呼吸系统频发的异质性疾病,多在凌晨发作和(或)夜间加剧。哮喘的临床表现主要为反复发作的喘息、咳嗽、气促和胸闷,以慢性炎症反应和气道高反应性为特征。呼吸道症状的严重程度和具体表现形式随时间而变化,可伴有可变的呼气气流受限^[1]。1970 年, Berkovich 等^[2]首次报道,支原体肺炎(mycoplasma pneumoniae, MP)与哮喘患儿喘息发作有直接联系。近年来关于哮喘病因学的研究逐渐增多。有学者提出,MP 感染为哮喘急性发作的重要诱发因素,并且是小儿哮喘迁延不愈、反复发作的主要独立危险因素。

另外,目前认为哮喘是一种多基因遗传病,是由环境因素和遗传因素相互作用而形成的。研究^[3]证实,人血清类黏蛋白 1 样蛋白 3(orosomucoid 1-like protein 3,ORMDL3)基因多态性与哮喘密切相关。ORMDL3 基因位于 17 号染色体上,有 3 个外显子和 2 个内含子,编码 1 个位于内质网膜的跨膜蛋白,可以调节 Ca^{2+} 浓度,从而导致未折叠蛋白反应,进而成为炎症反应发生的内源性诱因。为探讨 ORMDL3 基因单核苷酸多态性与儿童 MP 感染相关哮喘的相关性,本研究选取 ORMDL3 基因的 rs4794820 和 rs7216389 这 2 个位点进行基因型分析,比较各基因型在 MP 哮喘组与 MP 非哮喘组的分布差异,以期为儿童 MP 感染相关哮喘的早期识别和干预治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2015 年 12 月山东大学附属省立医院儿科诊治的 200 例 MP 住院患儿。随访观察 1 年以上,失访 6 例,最后纳入 194 例 MP 住院患儿为研究对象。所有入组患儿的治疗及临床资料使用均取得监护人同意,并由其签署知情同意书。根据我国 2008 年《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》^[4]及《2015 年全球哮喘防治倡议》^[5]关于儿童哮喘的诊断标准,将有反复或持续咳嗽和(或)喘息的患儿分为 MP 哮喘组,无上述表现的患儿为 MP 非哮喘组。收集所选患儿的血清免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)水平等资料。所有入选患儿均按照操作规范,测量身高、体质量,并进行

体格检查。

入选标准:(1)年龄 3~12 岁;(2)已于院外或入院后确诊为 MP,诊断标准符合中华医学会儿科学分会呼吸学组 2013 年修订的《儿童社区获得性肺炎管理指南》^[6]和 2015 年《儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识》^[7]中 MP 的诊断标准;(3)患儿或监护人能正确理解研究内容,并能清楚描述患儿发病情况。排除标准:(1)3 代直系亲属中有其他遗传性疾病者;(2)存在先天性支气管或肺发育异常、支气管扩张、气管内阻塞或气管外压迫、肺结核或先天性心脏病;(3)既往 1 年内有反复或持续咳嗽及喘息表现;(4)近期合并其他病原体引发的呼吸道感染者;(5)无法取得家长的知情同意者。

1.2 哮喘易感基因 ORMDL3 rs4794820、rs7216389 基因型检测 所选儿童均于入院当天治疗前留取外周静脉血 3 mL,采用天根自动核酸提取仪(TGuide S32 Nucleic Acid Extractor)提取目的基因 ORMDL3。根据 ORMDL3 基因中哮喘易感的 2 个位点(rs4794820、rs7216389)序列设计引物。

rs4794820 引物序列 ASP1: 5'-AGG AAG GAA GGA AGA AAG ACA G-3', ASP2: 5'-AGG AAG GAA GGA AGA AAG ACA A-3',产物大小 260 bp。rs7216389 引物序列 ASP1: 5'-GCA ACC CTG GAA AGT CAC AAA CAT-3', ASP2: 5'-GCA ACC CTG GAA AGT CAC AAA CAC-3',产物大小 150 bp。

应用 Bio-Mark™96.96 动态陈列集成流体通路(integrated fluidic circuit, IFC)Juno 系统对哮喘易感基因 ORMDL3 的 rs4794820、rs7216389 基因型进行检测。检测结果用 Fluidigm SNP Genotyping Analysis 软件分析。

1.3 血清 IgE 水平检测 清晨空腹采集静脉血 2 mL,采用双抗体夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)测定血清 IgE 水平。ELISA 试剂盒为北京欧蒙生物技术有限公司产品,操作过程由检验科医师严格按照说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2

检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般资料的比较 194 例患儿中,男性 136 例(70.1%),女性 58 例(29.9%),男女比例为 2.3 : 1。MP 哮喘组患儿 63 例(32.5%),其中,男性患儿 45 例(71.4%),女性患儿 18 例(28.6%),男女患儿比例为 2.5 : 1。MP 非哮喘组患儿 131 例(67.5%),其中,男性患儿 91 例(69.5%),女性患儿 40 例(30.5%),男女患儿比例为 2.3 : 1。MP 哮喘组平均年龄(6.43 ± 1.82)岁,MP 非哮喘组平均年龄为(6.13 ± 2.09)岁,两组年龄构成分布差异无统计学意义。

2.2 MP 哮喘与 ORMDL3 基因 rs4794820 位点基因型分布的关系 结果(表 1)表明:在 ORMDL3 基因的 rs4794820 位点有 AG、GG、AA 共 3 种基因型,MP 哮喘组和 MP 非哮喘组在此位点均以纯合子 GG 基因型的分布频率最高、纯合子 AA 分布频

率最低;两组在此位点的基因型差异均有统计学意义($P < 0.05$)。MP 哮喘组 GG 纯合子基因型和 G 等位基因频率均明显高于 MP 非哮喘组,但 MP 非哮喘组 AA 纯合子基因型和 A 等位基因频率明显高于 MP 哮喘组;两组此位点的等位基因差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 MP 哮喘与 ORMDL3 基因 rs7216389 位点基因型分布的关系 结果(表 2)表明:ORMDL3 基因的 rs7216389 位点有 TT、TC、CC 共 3 种基因型,MP 哮喘组和 MP 非哮喘组在此位点均以纯合子 TT 基因型的分布频率最高、纯合子 CC 分布频率最低;两组在此位点的基因型分布差异有统计学意义($P = 0.002$)。MP 哮喘组的 TT 纯合子基因型和 T 等位基因频率明显均高于 MP 非哮喘组($P < 0.05$);MP 非哮喘组 CC 纯合子基因型和 C 等位基因频率明显高于 MP 哮喘组。两组此位点等位基因差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 MP 哮喘组和非哮喘组患儿 ORMDL3 基因 rs4794820 位点的基因型分布

组 别	n(%)				
	基因型			等位基因	
	AG	GG	AA	A	G
MP 哮喘组(N = 63)	22(34. 9)	38(60. 3) *	3(4. 8) *	28(22. 2) *	98(78. 8) *
MP 非哮喘组(N = 131)	50(38. 2)	56(42. 7)	25(19. 1)	100(38. 2)	162(61. 8)

* $P < 0.05$ 与 MP 非哮喘组相比

表 2 MP 哮喘组和非哮喘组患儿 ORMDL3 基因 rs7216389 位点的基因型分布

组 别	基因型			等位基因		n(%)
	TT	TC	CC	T	C	
MP 哮喘组(N=63)	41(65.1)*	18(28.6)	4(6.3)*	100(79.4)*	26(20.6)*	
MP 非哮喘组(N=131)	59(45.0)	51(38.9)	21(16.0)	169(64.5)	93(35.5)	

* $P < 0.05$ 与 MP 非哮喘组相比

2.4 rs4794820 GG 基因型和 rs7216389 TT 基因型的 MP 哮喘危险度分析 结果(表 3)表明:MP 哮喘组在哮喘易感基因 ORMDL3 的 rs4794820 位点 GG 基因型分布频率(60.3%)明显高于 AG+AA 基因型(39.7%),在 rs7216389 位点 TT 基因型(65.1%)明显高于 TC+CC 基因型(34.9%);MP 非哮喘组在 ORMDL3 的 rs4794820 位点 GG 基因

型分布频率(42.7%)低于 AG+AA 基因型(57.3%),在 rs7216389 位点 TT 基因型(45.0%)低于 TC+CC 基因型(55.0%)。MP 哮喘组哮喘易感基因 ORMDL3 的 rs4794820 位点 GG 基因型分布频率(60.3%)和 rs7216389 位点 TT 基因型分布频率(65.1%)均明显高于 MP 非哮喘组,两基因型均为 MP 哮喘发生的危险因素($P = 0.022, P = 0.009$)。

表 3 哮喘易感基因 ORMDL3 rs4794820 GG 基因型和 rs7216389 TT 基因型的危险度分析

						<i>n</i> (%)
位点	基因型	MP 哮喘组(<i>n</i> = 63)	MP 非哮喘组(<i>n</i> = 131)	OR (95%CI)	χ^2 值	<i>P</i> 值
rs4794820	GG	38(60.3)	56(42.7)	2.036(1.104~3.754)	5.528	0.022
	AG + AA	25(39.7)	75(57.3)			
rs7216389	TT	41(65.1)	59(45.0)	2.274(1.221~4.236)	6.841	0.009
	TC + CC	22(34.9)	72(55.0)			

2.5 MP哮喘与血清IgE水平的关系 ELISA结果显示:63例MP哮喘组患儿血清IgE水平升高者18例(28.6%),131例MP非哮喘组患儿中19例血清IgE水平升高(14.5%),两组间差异有统计学意义($\chi^2=5.188, P=0.023$)。

3 讨论

目前,我国儿童哮喘的总体控制水平尚不理想,其发病率在近年来不断升高,给家庭及社会带来了沉重负担,也严重损害着儿童身心健康。哮喘是一种多基因遗传疾病,遗传度高达80%,具有明显的家族倾向性,其发病与遗传易感性和环境暴露的相互作用有关^[8-9]。Ober等^[10]的荟萃性分析结果发现,共有118个基因与哮喘或变应性疾病相关。有学者利用全基因组关联性研究^[3]分析发现,ORMDL3基因是儿童哮喘的潜在候选基因。

MP是一种通过黏附及细胞毒效应对呼吸道上皮细胞形成直接损伤,也通过免疫机制引起肺部感染及肺外系统损伤的细胞外病原体^[11],可引起咽炎、支气管炎和肺炎,诱发和加重哮喘^[12]。目前,对于小儿MP有无性别差异,相关报道结论不一,考虑与不同地区男女患儿的构成比差异较大有关。本研究纳入的194例MP患儿中,男性患儿约为女性患儿的2.3倍,提示在本研究病例中男性MP感染阳性率高于女性。已有文献显示,哮喘初发患者中,MP阳性率为50%以上,复发患者中约为20%,而哮喘急性发作期的MP阳性率为34.0%^[13]。王晔等^[14]研究发现,哮喘患儿的MP阳性率为48.8%,以学龄期儿童最高(达57.6%)。本研究显示,MP哮喘组的MP阳性率约为32.5%,比文献统计数据值偏低。这可能与本次研究选取患儿的病情较重,而一些病情较轻或症状不典型的患儿未纳入研究有关。

2007年,Nature首次报道ORMDL3基因单核苷酸多态性控制的遗传变异与哮喘发作高度相关^[15],携带该基因遗传变异的儿童患哮喘的风险增加60%~70%。目前ORMDL3基因作为哮喘易感基因的相关机制研究正在进行中。有研究^[15]显示,ORMDL3基因参与哮喘发病,推测ORMDL3能结合肌质网,抑制其三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase,ATP)活性,进而降低内质网中的ATP浓度,促进非折叠蛋白中激活转录因子6(activating transcription factor 6,ATF6)通路,活

化的ATF6通路促进肌质网钙泵的表达,进而促进炎症反应,引起气道高反应性,使患儿对哮喘的易感性增加,引发哮喘。之后有研究提出,ORMDL3蛋白有3种异构体^[16],是丝氨酸棕榈酰转移酶(serine palmitoyl transferase, SPT)的抑制剂,可作为鞘脂合成的限速酶,通过SPT抑制鞘脂的合成,调节机体内神经酰胺的产生,发挥负性调节作用;并且其可以独立于过敏或炎症反应。

目前,ORMDL3基因的单核苷酸多态性位点rs4794820、rs7216389已经被广泛研究。其中,rs4794820参与上皮细胞炎症反应和气道反应性的调节;rs7216389则因其碱基由C改变为T,影响了ORMDL3基因的表达,从而在哮喘的发病过程中发挥重要作用。韩国儿童中,rs4794820位点基因型为AG和AA的哮喘患儿相较于GG基因型的患儿,肺功能损害较低,嗜酸性粒细胞水平也更低^[17]。Tavendale等^[18]研究发现,苏格兰儿童中rs7216389位点为TC基因型的群体有发展为持续性哮喘的高危险性。本研究发现,rs4794820位点GG基因型和G等位基因在MP哮喘组的分布频率明显高于MP非哮喘组,而rs7216389位点TT基因型和T等位基因在MP哮喘组的分布频率明显高于MP非哮喘组;在基因型危险度分析中,rs4794820位点GG基因型和rs7216389位点TT基因型均是儿童MP相关哮喘的危险因素,而rs4794820位点AA基因型和rs7216389位点CC基因型则可能是儿童MP感染相关哮喘的保护因素。

IgE属于免疫球蛋白,可诱发I型变态反应,导致患儿出现可逆的气管阻塞,诱导哮喘发作。多项研究显示,MP感染后可导致IgE水平升高;IgE既可以是感染源,也可以是特异的过敏原^[19]。MP感染患儿具有更高水平的促炎细胞因子,总IgE水平升高^[20]。MP引起的呼吸道炎症反应和Th2细胞因子反应增加导致T淋巴细胞免疫功能失常,Th1/Th2比例降低。这是形成哮喘的启动因素,并在哮喘发展中成为维持因素,提示MP可诱发和加重哮喘。本研究显示,MP哮喘组患儿血清IgE水平升高的比例高于MP非哮喘组,提示MP感染后IgE水平升高是支气管哮喘患儿发病的重要危险因素,需要在临床工作中引起重视,早期识别,以避免哮喘的发生。

综上所述,MP相关哮喘患儿的病例对照研究发现,MP相关哮喘的发病率升高,而且ORMDL3

基因 rs4794820 位点 GG 纯合子基因型和 rs7216389 位点 TT 纯合子基因型是儿童 MP 感染相关哮喘的易感基因型,rs4794820 位点 AA 基因型和 rs7216389 位点 CC 基因型可能是其保护基因型;MP 感染后血清 IgE 水平升高,是 MP 感染相关哮喘的潜在危险因素。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016 年版)[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3): 167-181.
- [2] BERKOVICH S, MILLIAN S J, SNYDER R D. The association of viral and mycoplasma infections with recurrence of wheezing in the asthmatic child[J]. *Ann Allergy*, 1970, 28(2): 43-49.
- [3] MOFFATT M F, KABESCH M, LIANG L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 470-473.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(一)(2008 年修订)[J]. 中华医学信息导报, 2009, 24(1): 20-21.
- [5] 刘传合. 儿童支气管哮喘诊断与管理的新观点——2014—2015 年全球哮喘防治倡议的启示[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(16): 1223-1226.
- [6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)(上)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 745-752.
- [7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015 年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [8] 全国儿科哮喘协作组. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 729-735.
- [9] STRINA A, BARRETO M L, COOPER P J, et al. Risk factors for non-atopic asthma/wheeze in children and adolescents: a systematic review [J]. *Emerg Themes Epidemiol*, 2014, 11: 5.
- [10] OBER C, HOFFJAN S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery[J]. *Genes Immun*, 2006, 7(2): 95-100.
- [11] MEYER SAUTEUR P M, VAN ROSSUM A M, VINK C. *Mycoplasma pneumoniae* in children: carriage, pathogenesis, and antibiotic resistance[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2014, 27(3): 220-227.
- [12] WAITES K B, ATKINSON T P. The role of mycoplasma in upper respiratory infections[J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2009, 11(3): 198-206.
- [13] BISCARDI S, LORROT M, MARC E, et al. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(10): 1341-1346.
- [14] 王 晔, 黄 凯, 梁振山. 肺炎支原体感染与儿童哮喘及 IgE 水平的相关性研究[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(3): 234-235.
- [15] MILLER M, TAM A B, CHO J Y, et al. ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(41): 16648-16653.
- [16] ONO J G, WORGALL T S, WORGALL S. Airway reactivity and sphingolipids—implications for childhood asthma [J]. *Mol Cell Pediatr*, 2015, 2(1): 1-6.
- [17] YU J, KANG M J, KIM B J, et al. Polymorphisms in GSDMA and GSDMB are associated with asthma susceptibility, atopy and BHR[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2011, 46(7): 701-708.
- [18] TAVENDALE R, MACGREGOR D F, 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.
- [19] 尚云晓. 肺炎支原体感染与儿童哮喘[J]. 中国实用儿科杂志, 2011, 26(4): 250-252.
- [20] HASSAN J, IRWIN F, DOOLEY S, et al. *Mycoplasma pneumoniae*, infection in a pediatric population; Analysis of soluble immune markers as risk factors for asthma[J]. *Hum Immunol*, 2008, 69(12): 851-855.

[本文编辑] 叶 婷, 张艺鸣