

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.2018040010

· 论著 ·

白细胞介素-23受体基因多态性与变应性鼻炎易感性的相关性研究

韩玲¹,李颖²,王晓飞³,黄炜²,连军胜¹

(郑州大学附属郑州中心医院 1. 医务科; 2. 耳鼻咽喉头颈外科; 3. 转化医学中心, 河南 郑州 450007)

摘要: **目的** 研究白细胞介素-23受体(IL-23R)基因多态性与中国河南地区汉族人群变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)发病易感性间的关系。**方法** 收集114例河南地区汉族AR患者(AR组)及264例正常人群(对照组)全血样品进行研究。提取血液样本中的DNA,并应用PCR-Sanger测序法对DNA样本中IL-23R基因的多态位点rs7517847进行基因分型分析。**结果** 114例AR组中AA、AC、CC基因型频率分别为23.7%、56.1%和20.2%;264例对照组中AA、AC和CC基因型频率为40.5%、45.8%和13.6%。AR组中rs7517847位点的等位基因AA、AC、CC分布与正常对照组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 11.068, P = 0.004$);等位基因为CC基因型的个体患AR的比例为40.0%(23/59),高于AA基因型(20.1%)和AC基因型(34.6%)的个体。A和C等位基因频率在AR组与正常对照组分布无显著性差异($\chi^2 = 0.256, P = 0.187$)。**结论** IL-23R基因rs7517847位点的多态性与AR易感性有关;携带C等位基因且为CC基因型的个体患AR的风险性增大。

关键词: 白细胞介素-23受体;变应性鼻炎;基因检测;单核苷酸多态性;易感性

中图分类号:R765.21;Q343.1 文献标识码:A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2018,24(4):346-349]

Study on correlation between IL-23R gene polymorphisms and susceptibility of allergic rhinitis

HAN Ling¹, LI Ying², WANG Xiao-fei³, HUANG Wei², LIAN Jun-sheng¹

(1. Department of Medical Services, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China; 2. Department of Otolaryngology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China; 3. Translational Medical Center, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between susceptibility of allergic rhinitis (AR) and single nucleotide polymorphism (SNP) at rs7517847 in interleukin-23 receptor (IL-23R) in Henan Han population of China. **Methods** 114 AR patients of Han nationality from Henan Province and 264 unrelated healthy individuals from the same geographic region were enrolled in this study. DNA from blood samples was extracted and the genotypes of IL-23R polymorphisms (rs7517847) in DNA samples were genotyped using PCR-Sanger sequencing. **Results** AA, AC and CC genotype frequencies of 114 AR cases were 23.7%, 56.1% and 20.2%, respectively. AA, AC and CC genotype frequencies of the 264 controls were 40.5%, 45.8% and 13.6%, respectively. The difference of AA, AC and CC frequency distribution between the AR and control group was statistically significant ($\chi^2 = 11.068, P = 0.004$). The AR ratio in individuals with CC genotype was 40.0% (23/59), which was higher than those with AA genotype (20.1%) and AC genotype (34.6%). Their difference of A and C allele frequency distribution between the AR and control group was statistically insignificant ($\chi^2 = 0.256, P = 0.187$). **Conclusion** Polymorphism of IL-23R gene (rs7517847) is associated with susceptibility of AR in the Han Population in Henan Province. The risk of AR will be increased if the person carrying C allele and CC genotype.

基金项目:河南省教育厅2015年度高校重点科研项目资助计划(15A320015)。

作者简介:韩玲,女,本科,主任医师。

通信作者:李颖,Email: ikkoi@163.com

Key words: Interleukin-23R; Allergic rhinitis; Gene detection; Single-nucleotide polymorphism; Susceptibility

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2018, 24(4): 346-349]

变应性鼻炎(AR)是一种常见疾病,在全球范围内发病率呈上升趋势,其不良症状可引发哮喘、鼻息肉、慢性鼻窦炎等呼吸道炎症疾病。尽管环境因素在变应性疾病的发生发展中起重要作用,但AR的病因和病理学提示其具有较强的遗传性。越来越多的证据表明,基因多态性是AR遗传风险较高的原因,且已进行了广泛的研究^[1,2]。

白细胞介素-23受体(IL-23R)2002年由Parham等^[3]从Kit225细胞(hIL-2依赖的T细胞系)和人T细胞中克隆并鉴定得到的,与IL-12R β 1共同组成IL-23受体复合物。前期研究证实,IL-23R可通过介导CD4⁺T细胞分化促进炎症的发生,其作用机制是STAT3和NF-KB信号通路诱导幼稚CD4⁺T细胞向新型Th细胞-IL-17分泌性Th细胞(Th17/ThIL-17)分化,IL-23R通过与IL-12的协同作用直接刺激成熟Th17释放IL-17等特异性促炎症因子的表达,即所谓的IL-23-IL-23R-17新型免疫通路^[4]。胡嶝等^[5]在中国西南部地区的研究发现AR的遗传易感性与IL-23R基因多态性有明显相关性,且IL-23R的rs7517847位点的多态性与AR的易感性有关。为了进一步研究IL-23R基因多态性与变应性鼻炎的关系,本研究选择在河南地区AR患者和健康者进行对比分析,以探讨IL-23R基因多态性与AR遗传易感性的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2015年4月~2016年1月在郑州大学附属郑州中心医院就诊的AR患者114例作为实验组(AR组),其中男77例,女37例;年龄8~79岁,中位年龄(41.12 \pm 7.81)岁。同期收集本院体检中心264例健康人群作为对照组,其中男150例,女114例;年龄3~83岁,中位年龄(43.75 \pm 9.23)岁。纳入标准:①AR组患者符合国际通用诊断标准(ARIA),由我科门诊医师诊断患者为变应性鼻炎;②对照组:无AR临床症状和家族病史,收集标本前4周内无上呼吸道感染病史;无慢性鼻窦炎、哮喘、皮炎、湿疹等过敏性疾病病史或鼻部肿瘤、自身免疫性疾病病史或鼻部肿瘤,自身免疫性疾病等病史;③所有研究对象为居住河南地区5年以上的汉族

人群,彼此之间无血缘关系;④所有研究对象均签署知情同意书并经由郑州大学附属郑州中心医院伦理委员会许可。排除标准:①受检前2周内使用糖皮质激素、抗组胺药物、D受体阻滞剂、精神类药物者以及妊娠妇女;②患糖尿病、癌症、肝肾功能不全、甲状腺疾病、免疫缺陷疾病、接受器官移植和严重营养不良等疾病者。

1.2 外周血基因组DNA提取

采集所有研究对象静脉血4 mL,用全血DNA提取试剂盒提取患者外周血基因组DNA,操作步骤按说明书进行,并对基因组DNA质量进行纯度(计算A260/A280的比值,要求在1.7~1.9)及完整性(0.8%琼脂糖电泳检测DNA)鉴定,然后放入成像仪中拍照,纯化后的基因组DNA置于-80℃保存备用。

1.3 仪器与试剂

凝胶成像系统(BIO-RAD,美国);水平电泳仪(北京六一仪器厂);PCR扩增仪(ABI公司,美国);全血DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京);2 \times PCR master mix(莱枫生化科技有限公司,上海);DNA marker(天根生化科技有限公司,北京);引物(Invitrogen 生物技术有限公司,上海)。

1.4 rs7517847位点基因多态性分析

1.4.1 PCR扩增目的基因 rs7517847位点的2条引物序列:上游引物 CCTACCATCTCACTGTCTC-CTCTC;下游引物 GGACACAGCCCATAAAGATACAAAC。20 μ L PCR反应体系为5 \times Taq Buffer 4 μ L; MgCl₂ 2 μ L; 10 mmol/L dNTP 0.4 μ L; 模板DNA 2 μ L; 上游引物 2 μ L; 下游引物 2 μ L; Taq 酶(5 U/ μ L) 0.1 μ L; ddH₂O 7.5 μ L。PCR扩增程序:1)95℃预变性7 min;2)94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 20 s,共35个循环;3)72℃延伸7 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

1.4.2 基因型鉴定 应用PCR-Sanger分析方法将PCR产物用相对应的限制性内切酶进行消化。20 μ L酶切反应体系组成: ddH₂O 15.3 μ L; RE 10 \times Buffer 2 μ L; BSA(10 μ g/ μ L) 0.2 μ L; DNA 2 μ L; 限制性内切酶(10 μ g/ μ L) 0.5 μ L,将其混匀后,置37℃水浴2 h,取10 μ L酶切产物进行8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,根据电泳结果直接鉴定样本基因型。

1.5 统计学方法

基因型的数量和频率通过直接计数法获得,

AR 组和对照组等位基因频率分析采用 χ^2 检验 (SPSS 17.0)。两组间性别和工作环境比较采用 χ^2 检验, 年龄比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况

为了评定环境因素与两组基因多态性的关系, 我们将两组的工作环境进行了分类, AR 组 114 人中男 77 人, 女性 37 人; 平均年龄 (41.12 ± 7.81) 岁, 其中室内工作 71 人, 室外工作 43 人; 对照组 264 人, 男 150 人, 女 114 人, 平均年龄 (43.75 ± 9.23) 岁, 其中室内工作 151 人, 室外工作 113 人。经统计分析两组在性别、年龄和工作环境差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 IL-23R 基因分型以及对变应性鼻炎的影响

IL-23R 中 A > C 基因分型采用 PCR-Sanger 测序法进行。测序结果见图 1。114 例 AR 组中 AA、AC、CC 基因型分别为 27 例、64 例和 23 例, 基因型频率分别为 23.7%、56.1% 和 20.2%; 264 例对照组中 AA、AC 和 CC 基因型分别为 107 例、121 例和 36 例, 基因型频率为 40.5%、45.8% 和 13.6%, 结果如表 1 所示。rs7517847 的 3 种基因型 (AA、AC、CC) 频率在实验 AR 组与对照组之间的分布差异均具有统计学意义 ($\chi^2 = 11.068, P = 0.004$)。等位基因 A 和 C 在 AR 组和对照组的分布频率无统计学意义 ($\chi^2 = 0.256, P = 0.187$)。此外, 等位基因为 CC 基因型的个体患 AR 的比例为 40.0% (23/59), 高于 AA 基因型 (20.1%) 和 AC 基因型 (34.6%) 的个体。以上结果表明 IL-23R 基因 rs7517847 位点的多态性与河南地区人群 AR 易感性有关; 携带 C 等位基因且为 CC 基因型的个体患 AR 的危险性增大, 这可能是患 AR 的易感因素之一。

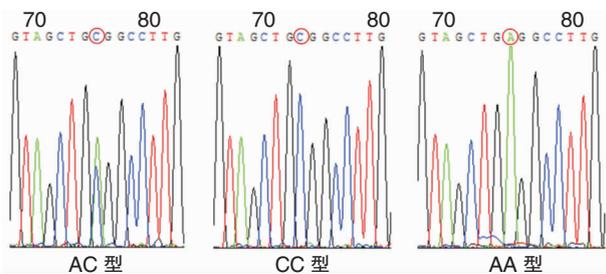


图 1 IL-23R A > C 基因分型结果

表 1 AR 组和对照组人群中 IL-23R A > C rs7517847 基因型和等位基因的分布频率 [例(%)]

SNP 位点	基因型及等位基因	对照组 (n = 264)	实验组 (n = 114)	χ^2	P
rs7517847	AA	107 (40.5)	27 (23.7)	11.068	0.004
	AC	121 (45.8)	64 (56.1)		
	CC	36 (13.6)	23 (20.2)		
	A	335 (63.4)	118 (51.8)		
	C	193 (36.6)	110 (48.2)	0.256	0.187

3 讨论

AR 是一种由 IgE 介导的, 并有多免疫活性细胞和细胞因子等参与的鼻黏膜非感染性炎症性疾病。作为鼻腔疾病中发病率最高的疾病, 已成为一个全球健康问题, 发病率在近 20 年呈全球性迅速上升趋势^[6-8]。AR 与鼻窦炎、鼻息肉、结膜炎和支气管哮喘等疾病密切相关, 已成为呼吸系统中的重要疾病^[9]。近年的分子生物学研究发现某些基因的多态性与 AR 相关联, 但是受人群、遗传与环境因素等问题的限制, 尚未得出普遍性结论。因此, 进一步寻找 AR 的易感基因具有重要意义。

IL-23R 是一种新型的膜表面蛋白受体, 介导细胞内信号转导, 对细胞功能进行调节并发挥多种生物学效应。IL-23R 可以促进 T 细胞尤其是 CD4⁺T 细胞增殖, 在诱导产生 γ 干扰素, 维持 Th17 细胞亚群的活性, 扩增及诱导 Th17 细胞分泌大量促炎症介质^[9-10]。IL-23R 单核苷酸多态性会引起转录 mRNA 剪接的改变及所编码氨基酸序列的改变, 进而影响细胞的功能, 使细胞免疫发生紊乱, 从而导致慢性炎症^[11]。

一些研究证实 IL-23R 基因 rs7517847 位点与多种疾病有关。张吉林等^[12]报道 rs7517847 位点的多态性均与吉林人群强直性脊柱炎易感性有关; 且携带 G 等位基因 (或 A 等位基因) 且为 GG (或 AA) 基因型的个体患强直性脊柱炎的概率增大。Amre 等^[13]在加拿大的儿童研究中 (259 例克罗恩病和 139 例对照) 发现 rs7517847 位点的多态性与克罗恩病密切相关。Liu 等^[14]在中国汉族男性人群中收集了 400 例痛风患者和 582 例对照, 结果发现 rs7517847 位点的多态性与痛风的发病率显著性相关。

本研究对 378 例样本 (114 例 AR 患者, 264 例健康者) 进行了 IL-23R 基因 rs7517847 位点的 SNP 检测。研究结果显示在 AR 组 rs7517847 位点检出

的3种(AA,AC和CC)基因型频率及2种等位基因(A,C)频率。rs7517847的3种基因型(AA,AC,CC)频率在实验AR组与对照组之间的分布差异均具有统计学意义($\chi^2 = 11.068, P = 0.004$)。等位基因A和C在AR组和对照组的分布频率无统计学意义($\chi^2 = 0.256, P = 0.187$)。此外,等位基因为CC基因型的个体患AR的比例为40.0%(23/59),高于AA基因型(20.1%)和AC基因型(34.6%)的个体。且可以认为rs7517847位点携带CC基因型的个体发生AR的风险较高。胡頔等在中国西南部地区的研究发现IL-23R的rs7517847位点的多态性与AR的易感性有关,并发现rs7517847位点GG基因型和G等位基因是AR的易感因素^[5,15]。这与本文报道的携带C等位基因且为CC基因型的个体患AR的危险性增大这一结果并不一致,可能是由于地区差异引起的。

综上所述,IL-23R基因多态性对河南汉族人群变应性鼻炎的发生率具有一定影响,但今后将深入大样本、多基因研究验证实验结果准确性,并阐明中国河南地区汉族人群基因多态性与变应性鼻炎易感性的相关性,为寻找AR易感基因提供科学依据。

参考文献:

[1] 洪苏玲. 浅谈变应性鼻炎的基因多态性[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(9):781-783.
Su HL. Discussion on single nucleotide polymorphism of allergic rhinitis [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2015, 29(9):781-783.

[2] 张靓冉, 阮标, 余咏梅. 变应性鼻炎治疗的研究进展[J]. 中国现代医生, 2015, 53(18):155-160.
Zhang LR, Ruan B, Yu YM. Recent advances in the treatment of allergic rhinitis[J]. China Modern Doctor, 2015, 53(18):155-160.

[3] Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R[J]. J Immunol, 2002, 168(11):5699-5708.

[4] Kwok SK, Cho ML, Her YM, et al. TLR2 ligation induces the production of IL-23/IL-17 via IL-6, STAT3 and NF-kB pathway in patients with primary Sjogren's syndrome[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2):R64.

[5] 胡頔, 胡国华, 魏萍. IL-23R基因多态性与变应性鼻炎遗传易感性研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(2):85-89.
Hu D, Hu GH, Wei P. Association analysis of IL-23R polymorphisms in allergic rhinitis[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2014, 28(2):85-89.

[6] Davidsson A, Karlsson MG, Hellquist HB. Allergen-induced changes of B-cell phenotypes in patients with allergic rhinitis[J]. Rhinology, 2016, 32(4):184-190.

[7] Liu J, Hong J, Zhang CH, et al. Acupuncture for allergic rhinitis: a systematic review and meta analysis [J]. Journal of Acupuncture & Tuina Science, 2016, 14(6):426-437.

[8] Christensen SH, Timm S, Janson C, et al. A clear urban-rural gradient of allergic rhinitis in a population-based study in Northern Europe[J]. Eur Clin Respir, 2016, 3:33463.

[9] 梁美君, 陈冬, 林志斌, 等. 中国华南地区局部变应性鼻炎患者的临床特征[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2016, 37(4):585-590.
Liang MJ, Chen D, Lin ZB, et al. Clinical characteristics in patients with local allergic rhinitis from Southern China[J]. Journal of Sun Yat-sen University(Medical Sciences), 2016, 37(4):585-590.

[10] Morishima N, Mizoguchi I, Takeda K. TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 386(1):105-110.

[11] Jiang Z, Hennein L, Tao Y, et al. Interleukin-23 receptor gene polymorphism may enhance expression of the IL-23 receptor, IL-17, TNF- α and IL-6 in Behcet's disease[J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0134632.

[12] 张吉林, 刘冲, 单雪梅, 等. IL-23R基因多态性与吉林人群强直性脊柱炎易感性的关联研究[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(2):230-235.
Zhang JL, Liu C, Shan XM, et al. Correlation between IL-23R gene polymorphisms and susceptibility of ankylosing spondylitis [J]. Chinese Journal of Immunology, 2015, 31(2):230-235.

[13] Amre DK, Mack D, Israel D, et al. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children[J]. Am J Gastroentero, 2008, 103(3):615-620.

[14] Liu S, He H, Yu R, et al. The rs7517847 polymorphism in the IL-23R gene is associated with gout in a Chinese Han male population[J]. Mod Rheumatol, 2015, 25(3):449-452.

[15] Hu D, Hu G, Zhu J, et al. Association between polymorphisms of the IL-23R gene and allergic rhinitis in a Chinese Han population [J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63858.

(收稿日期:2017-06-18)