

## 论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2302-04

### TIM-3 基因多态性与儿童咳嗽变异性哮喘的关系

吴立强,陈建平,何念海,桂芹,晏玲,陈盛 (400038 重庆,第三军医大学西南医院儿科)

**[摘要]** **目的** 探讨重庆地区汉族人群中哮喘免疫调节基因 TIM-3 启动子区 3 个单核苷酸多态性(SNP)位点与儿童咳嗽变异性哮喘(CVA)易感性的关联性。**方法** 选取本科就诊 CVA 儿童 200 例,平均年龄 6.8 岁,作为 CVA 组,对照组儿童 215 例平均年龄 6.9 岁;采用(PCR-RFLP)聚合酶链反应-限制性片段长度多态性检测所有研究对象 TIM-3 基因启动子区 Rs1051746、Rs4704853、Rs10053538 三个多态性位点基因多态性,进行病例对照研究分析。**结果** PCR-RFLP 检测结果显示, Rs1051746 位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)在哮喘组和对照组相比差异有统计学( $OR=3.405, 95\% CI 1.214 \sim 9.551, P < 0.05$ ), CVA 患儿组 T 等位基因频数(4%)显著高于健康组(1%); Rs4704853、Rs10053538 位点基因型频数及等位基因频数分布差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );单体型 T-C-G 在两组中差异有统计学意义( $P=0.029, OR=3.232, 95\% CI 1.066 \sim 9.796$ );分别比较各位点 CVA 患儿不同基因型的皮肤点刺、总 IgE、EOS 水平,并未发现有统计学差异的指标( $P > 0.05$ )。**结论** TIM-3 启动子区的 Rs1051746 与儿童咳嗽变异性哮喘易感性相关,携带 T-C-G 单体型的人群罹患 CVA 的风险性可能较正常人群高,各位点基因多态性可能与皮肤点刺、总 IgE、EOS 水平无关。

**[关键词]** 儿童咳嗽变异性哮喘;单核苷酸多态性;TIM-3;单体型

**[中图分类号]** R394.4;R441.5;R725.622.5 **[文献标志码]** A

### Relationship between TIM-3 polymorphism and childhood cough variant asthma

Wu Liqiang, Chen Jianping, He Nianhai, Gui Qin, Yan Ling, Chen Sheng (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To elucidate the relationship between the single nucleotide polymorphism (SNP) of the asthma immune regulator gene TIM-3 and the susceptibility of childhood cough variant asthma (CVA) in Han population in Chongqing. **Methods** PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) was used to test the genotypes of the polymorphism loci of Rs1051746, Rs4704853 and Rs10053538 in TIM-3 promoter region among 200 CVA children (CVA group, 6.8 years old on average) and 215 controls (control group, 5.9 years old on average). **Results** The results of PCR-RFLP showed that the SNP of the Rs1051746 in TIM-3 gene was significantly different between the CVA group and the control group ( $OR=3.405, 95\% CI 1.214 \sim 9.551, P < 0.05$ ), and the frequency of allele T in the CVA group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), suggesting the SNP of the Rs1051746 was associated with childhood CVA. The genotype and allele frequencies of the Rs4704853 and Rs10053538 showed no significant difference between the CVA group and the control group, suggesting the SNP of the Rs4704853 and Rs10053538 were not associated with childhood CVA ( $P > 0.05$ ). There was statistically significant difference of the haplotype T-C-G between the CVA group and the control group ( $P < 0.05$ ), but the differences of skin prick test (SPT) and the levels of total IgE (TlgE) and eosinophils (EOS) among the CVA children with different genotypes at Rs1051746, Rs4704853 and Rs10053538 were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The SNP of Rs1051746 in the TIM-3 gene is associated with childhood CVA, and the children with haplotype T-C-G may be more likely affected by CVA compared with those without haplotype T-C-G. There may be no relationship between the SNP of Rs1051746, Rs4704853 and Rs10053538 and the levels of SPT, TlgE and EOS.

**[Key words]** childhood cough variant asthma; single nucleotide polymorphism; TIM-3; haplotype

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600686) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5062).  
Corresponding author: He Nianhai, E-mail:henianhai@vip.sina.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30600686);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5062)

**[通信作者]** 何念海, E-mail:henianhai@vip.sina.com

哮喘近些年来在全球范围有逐渐增加的趋势,其病因既受环境因素的影响,又有明显的遗传倾向,是一种复杂的多基因遗传病<sup>[1]</sup>。为研究哮喘的易感基因,McIntire等<sup>[2]</sup>在小鼠11号染色体上首先发现了1个调节T细胞和气道表型的新基因T细胞免疫球蛋白粘蛋白域(T cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM)基因家族,从此揭开了TIM家族的神秘面纱。人类的TIM基因家族有3个:TIM-1、TIM-3和TIM-4,定位于染色体5q33.2,此区域是哮喘的主要遗传易感位点之一<sup>[3]</sup>。咳嗽变异性哮喘(cough variant asthma, CVA)作为哮喘的特殊类型,在儿童慢性咳嗽构成比中占第1位<sup>[4-5]</sup>,是引起儿童就诊的主要原因之一。TIM-3基因多态性与自身免疫性疾病、过敏性疾病、免疫耐受和肿瘤免疫性疾病之间关系研究较多,本研究通过TIM-3基因启动子区Rs1051746、Rs4704853、Rs10053538三个多态性位点与儿童咳嗽变异性哮喘的关系,希望有助于儿童咳嗽变异性哮喘的诊断和治疗。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

本研究选取第三军医大学西南医院2008年9月至2011年5月儿科门诊及住院患者,咳嗽变异性哮喘组200例(女性112例,男性82例),平均年龄6.8岁,均来自西南地区汉族人群,无血缘关系;健康对照组215例(女性125例,男性90例),平均年龄6.9岁,均来自西南地区汉族人群,无血缘关系;两组在性别方面差异无统计学差异( $P > 0.05$ )。儿童咳嗽变异性哮喘诊断标准参照儿童慢性咳嗽诊断与治疗指南(试行)<sup>[6]</sup>,排除伴有其他慢性疾病者。健康组选择同期来院就诊患儿及健康体检者,标准如下:①无哮喘及其他变应性疾病史;②排除伴有其他慢性疾病。本研究获得儿童及其家长的知情同意,并通过第三军医大学医学伦理委员会的批准。

### 1.2 皮肤点刺,总IgE和EOS检测及阴性和阳性判断

具体方法参考文献<sup>[7]</sup>。

### 1.3 基因组DNA提取及分析

具体方法参考文献<sup>[8]</sup>。

### 1.4 多态性位点的选择及引物设计

参照GenBank中TIM-3基因序列(编码CTB120-L21),选取启动子区Rs1051746、Rs4704853、Rs10053538三个多态性位点,参考文献<sup>[9]</sup>设计引物,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,详细资料见表1。

### 1.5 PCR反应体系、反应条件程序及酶切分型

DNA扩增选择高保真KOD-plus-201聚合酶(TOYOBO Japan)在PCR扩增仪(Bio-Rad, USA)上进行。PCR反应总体系50  $\mu$ l,包括50 ng的DNA模板,0.2 mmol/L的dNTPs,0.2  $\mu$ mol/L各个引物,1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ l和1 U的KOD-Plus-DNA聚合酶。PCR循环情况包括最初变性温度94  $^{\circ}$ C 2 min后,94  $^{\circ}$ C变性40 s,退火40 s温度Rs1051746、Rs4704853和Rs10053538分别是60.0、55.0  $^{\circ}$ C和60.0  $^{\circ}$ C,72  $^{\circ}$ C延伸40 s,共30个循环,最终延伸10 min。Rs1051746位点经Taq I酶切后可分为GG(132 bp,37 bp)、TT(169 bp)、GT(169 bp,132 bp,37 bp);Rs4704853位点经BsoB I酶切后可分为CC(141 bp,132 bp)、TT(273 bp)、CT(273 bp,141 bp,132 bp);Rs10053538位点经Bsi I酶切后可分为GG(66 bp,338 bp)、TT(404 bp)、GT(66 bp,404 bp,338 bp)。

### 1.6 统计学分析

采用在线Arlequin软件对病例组和对照组进行Hardy-Weinberg平衡检验。通过Fisher  $\chi^2$ 检验(SPSS 17.0)来区分CVA组和对照组的等位基因和基因型之间的统计学差异,并分析咳嗽变异性哮喘遗传多态性的风险比值比(OR) and 95%可信区间(CI)。采用在线SHEsis(<http://analysis.bio-x.cn/my-analysis.php>)软件进行两两SNP位点的连锁不平衡分析并构建单体型进行病例对照研究。

## 2 结果

经检验CVA组和对照组3个位点的等位基因和基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡检验( $P > 0.05$ ),群体具有代表性。PCR-RFLP分型结果:Rs1051746检出2种基因型:G/G、G/T;Rs4704853位点检出2种基因型:C/C、C/T;Rs10053538位点检出3种基因型:G/G、G/T和T/T。TIM-3三个位点基因型与等位基因频数见表2。结果显示:与对照组儿童比较,CVA患儿TIM-3基因Rs1051746多态性位点的基因型及等位基因频率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),CVA组患儿T等位基因频数(4%)显著高于健康对照组(1%);Rs4704853、Rs10053538位点基因型频数及等位基因频出分布差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 TIM-3启动子区基因多态性位点引物设计

多态性位点	引物序列	退火温度( $^{\circ}$ C)	产物(bp)	限制性内切酶
Rs1051746 (-574G/T)	上游:5'-AGAAGAAGGATGAGAGTGAGCCTTATGCTGGGAGTTTC-3' 下游:5'-ACTCAAATCAGTCCTTCATC-3'	60.0	169	Taq I
Rs4704853 (-882C/T)	上游:5'-CTTTTGCTTTTAAGGTGTC-3' 下游:5'-TTCAAACCTTCCAACCTCTTC-3'	55.0	273	BsoB I
Rs10053538 (-1516G/T)	上游:5'-GCCTTGACCAAGTTCATGCT-3' 下游:5'-ACCACCCCGGATAATTTTGT-3'	60.0	404	Bsi I

表 2 TIM-3 启动子区 3 个多态性位点基因型及等位基因频率

多态性	基因型/ 等位基因	哮喘组 例数(%)	对照组 例数(%)	OR (95% CI)	P
Rs1051746	G/G	185(96)	210(98)	1.000	0.014
	G/T	15(4)	5(2)	3.405(1.214~9.551)	
	G	385(96)	425(99)	1.000	0.015
	T	15(4)	5(1)	3.312(1.192~9.197)	
Rs4704853	C/C	195(98)	213(99)	1.000	0.215
	C/T	5(3)	2(1)	2.731(0.524~14.237)	
	C	395(99)	428(100)	1.000	0.217
Rs10053538	T	5(1)	2(0)	2.709(0.523~14.042)	
	G/G	169(85)	190(88)	1.000	0.508
	G/T	30(15)	24(11)	1.405(0.790~2.498)	
	T/T	1(1)	1(0)	1.124(0.070~18.114)	
	G	368(92)	404(95)	1.000	0.270
	T	32(8)	26(6)	1.351(0.790~2.310)	

Rs4704853 位点与 Rs10053538 位点存在较弱的连锁不平衡( $r^2 = 0.338$ ), 3 个位点构建的频率 > 3% 的单体型分析, G-C-G、G-C-T 单体型在哮喘组与对照组中差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而 T-C-G 单体型在两组中差异有统计学意义 [ $P = 0.029, OR = 3.232 (1.066 \sim 9.796)$  ]。见表 3。

表 3 TIM-3 基因两个位点构成的单体型在对照组和 CVA 组的分布

单体型*	CVA 组 (%)	对照组 (%)	$\chi^2$	OR(95% CI)	P
G-C-G	88.1	92.7	3.693	0.616 (0.374 ~ 1.013)	0.055
G-C-T	7.2	5.7	0.853	1.300 (0.744 ~ 2.273)	0.356
T-C-G	3.1	1.0	4.786	3.232 (1.066 ~ 9.796)	0.029

\*: 单体型组成顺序: Rs1051746、Rs4704853、Rs10053538 单体型频率 > 3%

皮肤点刺试验结果(SPT)、血清总 IgE 测定及嗜酸性粒细胞计数(EOS)是临床判断哮喘等变态性疾病的常用指标,检测 CVA 患儿 3 种临床指标与基因多态性之间关系,均未发现其差异有统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 4。

表 4 咳嗽变异性哮喘患儿 SPT、TlgE 和 EOS 与基因多态性之间的关系

临床指标	Rs1051746			Rs4704853			Rs10053538			
	G/G	G/T	P	C/C	C/T	P	G/G	G/T(T/T)	P	
SPT	阴性	29	32	0.878	25	33	0.213	33	32	0.873
	阳性	64	75		75	67		66	69	
TlgE	阴性	13	11	0.828	18	16	0.851	20	25	0.503
	阳性	87	89		83	83		78	77	
EOS	阴性	35	40	0.145	25	28	0.821	38	30	0.882
	阳性	72	53		72	75		72	60	

### 3 讨论

TIM 基因家族在哮喘等变态反应性疾病和自身免疫性疾病的发生、发展中起到至关重要的作用<sup>[10]</sup>。人类 TIM 基因家族在参与 Th1/Th2 细胞介导的免疫调节中起到关键作用<sup>[3]</sup>。TIM-3 基因编码的蛋白质由 78

个氨基酸的胞质部分, 21 个氨基酸的跨膜部分和 181 个氨基酸的胞外区组成, 并表达于活化 Th1 细胞表面、树突状细胞或恶性上皮组织<sup>[11]</sup>。TIM-3 分子的启动子和编码区域均发现有 SNP 存在, 并且这些 SNP 可能与机体对疾病的易感性或耐受性相关<sup>[12]</sup>。

人类 TIM-3 基因长约 23 kb, 所编码的跨膜糖蛋白包含 301 个氨基酸。TIM-3 是一类具有基序的 I 型膜蛋白, 其蛋白分子的细胞外区含有 1 个免疫球蛋白 V 区, 1 个富含丝氨酸和苏氨酸残基的黏蛋白区, 胞浆区具有 6 个酪氨酸, 其中 1 个属于酪氨酸磷酸化基序部分。TIM-2, 3 蛋白的细胞外区具有 4 个 N-连接位点和 5 个 O-糖基化连接位点。TIM-3 分子主要表达在终末期的 Th1 细胞表面, 对 Th1 细胞起负性调控作用<sup>[13-14]</sup>。McIntire 等<sup>[2]</sup>通过基因组 DNA 分析显示 TIM-3 多态性与 Tapr(气道高反应性调节位点)完全分离, TIM-3 基因在小鼠和人类的 Th1 细胞表面特异性表达, TIM-3 基因多态性与哮喘, 自身免疫性疾病相关。

本研究对重庆地区汉族人群进行 TIM-3 基因启动子区 Rs1051746、Rs4704853、Rs10053538 三个多态性位点的基因型检测, 发现 3 个多态性位点在检测人群中均存在。TIM-3 启动子区的 Rs1051746 与儿童咳嗽变异性哮喘易感性相关, 携带 T-C-G 单体型的人群, OR 值 3.232, 95% CI 为 1.066 ~ 9.796, 罹患 CVA 的风险性较正常人群高, 但携带 T-C-G 单体型在 CVA 人群中的比例较低, 尚不能排除由于抽样误差及样本量太少的影响。CVA 患儿各位点基因多态性与皮肤点刺、总 IgE、EOS 水平间的相关性分析未得出有统计学差异的结论, 分析可能的原因是 TIM-3 启动子区 Rs1051746、Rs4704853、Rs10053538 基因多态性变异不影响皮肤点刺、总 IgE、EOS 水平, Rs1051746 位点不是通过影响皮肤点刺、总 IgE、EOS 水平的途径来致病。Xu 等<sup>[15]</sup>对 TIM-3 基因 -1541C > T, rs4704853 (-882C > T), rs10515746 (-574G > T) 和 +4259G > T 4 个位点的 100 多例病例对照研究发现, +4259G > T 位点的变异与宁夏回族人群类风湿性关节炎发生有关。王燕等<sup>[16]</sup>对新疆维吾尔族、汉族人群 TIM-3 基因启动子区 rs10053538(-1516G/T)、rs6555849 两个位点, 外显子区的 rs10515746(-574G > T)、rs4704853(-882C > T) 位点及位于内含子区的 rs13170556 和 rs6555849 位点的单核苷酸多态性进行病例对照研究发现与过敏性鼻炎的易感性无关。Chae 等<sup>[17]</sup>在韩国人群中研究发现 TIM-3 基因的 +4259 G/T 多态性与哮喘无相关, 但与过敏性鼻炎和类风湿性关节炎相关; -574T/G 多态性与

哮喘、过敏性鼻炎和类风湿关节炎相关。Li等<sup>[18]</sup>在中国人群中研究发现TIM-3基因rs9313439和rs10515746位点基因多态性与系统性红斑狼疮无相关。张才成等<sup>[19]</sup>在中国湖北地区人群,对153例哮喘和130例健康者采用PCR-RFLP研究表明TIM-3基因启动子区-1541 C/T位点多态性与哮喘无关,启动子区-574 T/G多态性与哮喘相关,与韩国学者Chae等<sup>[17]</sup>研究一致。国内胡丽华等<sup>[20]</sup>研究再次证实湖北汉族儿童TIM-3启动子区存在多态性变异,其中-574 T/G多态性可能与湖北汉族儿童哮喘易感性有关。随后,李际盛等<sup>[21]</sup>对山东汉族人群的研究也支持TIM-3基因启动子区-574 T/G多态性与哮喘相关,还证实启动子区-882 T/C多态性与哮喘相关,与本研究结果一致。以上研究结果表明人类TIM-3基因多态性与哮喘、变应性鼻炎、类风湿关节炎等变态反应性疾病的易感性有关。

虽然在本研究中发现TIM-3启动子区该3个位点的多态性纯合基因型在个体中不存在或者存在极低,这可能与长期的遗传学进化选择相关,但本实验结果依然提示对于儿童咳嗽变异性哮喘的发生,TIM-3基因启动子区-574 T/G多态性仍是一个重要的易感危险因素,其构成的单体型也在CVA患儿及对照组之间存在差异。未发现CVA患儿3种基因多态性与皮肤点刺、总IgE、EOS水平有关,期待大样本多中心的研究证实TIM-3启动子区基因多态性与皮肤点刺、总IgE、EOS水平间的关系,将有助于儿童咳嗽变异性哮喘分子流行病学研究。

#### 参考文献:

[1] Umetsu D T. Hygiene revisited: Microbes, apoptosis and TIM-1 in the development of asthma[J]. Paediatr Respir Rev, 2010, 11(Suppl 1): S3.

[2] McIntire J J, Umetsu S E, Akbari O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family [J]. Nat Immunol, 2001, 2(12): 1109-1116.

[3] Meyers J H, Sabatos C A, Chakravarti S, et al. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases [J]. Trends Mol Med, 2005, 11(8): 362-369.

[4] 杨娟, 刘恩梅, 魏金凤, 等. 重庆地区儿童慢性咳嗽病因构成比及其随访[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(6): 449-453.

[5] 中国儿童慢性咳嗽病因构成比研究协作组. 中国儿童慢性咳嗽病因构成比多中心研究[J]. 中华儿科杂志, 2012, 50(2): 83-92.

[6] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童慢性咳嗽诊断与治疗指南(试行) [J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(2): 104-107.

[7] 陈建平, 王刚, 汪万军, 等. 皮肤点刺、总IgE和EOS对儿童哮喘的诊断价值[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(7): 682-685.

[8] 陈建平, 赵婉莹, 何念海, 等. TIM-4基因多态性与儿童哮喘的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(2): 120-123.

[9] 朱圣韬, 曹邦伟, 徐昌青, 等. TIM-3基因启动子区多态性与胃癌易感的相关性研究[J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(3): 299-303.

[10] Freeman G J, Casasnovas J M, Umetsu D T, et al. TIM genes: a family of cell surface phosphatidyserine receptors that regulate innate and adaptive immunity [J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 172-189.

[11] Golden-Mason L, Palmer B E, Kassam N, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells [J]. J Virol, 2009, 83(18): 9122-9130.

[12] Jones R B, Ndhlovu L C, Barbour J D, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection [J]. J Exp Med, 2008, 205(12): 2763-2779.

[13] Monney L, Sabatos C A, Gaglia J L, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease [J]. Nature, 2002, 415(6871): 536-541.

[14] Khademi M, Illes Z, Gielen A W, et al. T cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis [J]. J Immunol, 2004, 172(11): 7169-7176.

[15] Xu J, Yang Y, Liu X, et al. The -1541 C>T and +4259 G>T of TIM-3 polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in a Chinese Hui population [J]. Int J Immunogenet, 2011, 38(6): 513-518.

[16] 王燕, 刘志连, 孙捷, 等. 新疆维吾尔族和汉族人群Tim-3基因多态性与变应性鼻炎的相关性研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 46(9): 712-717.

[17] Chae S C, Park Y R, Lee Y C, et al. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population [J]. Hum Immunol, 2004, 65(12): 1427-1431.

[18] Li W X, Chen G M, Yuan H, et al. Polymorphisms of the TIM-1 and TIM-3 genes are not associated with systemic lupus erythematosus in a Chinese population [J]. Mutagenesis, 2011, 26(4): 507-511.

[19] 张才成, 吴健民, 崔天益, 等. 湖北汉族人群TIM-3基因多态性与变应性哮喘的相关性[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(1): 74-77.

[20] 胡丽华, 崔天益, 张才成, 等. 湖北地区汉族变应性哮喘患儿TIM-3启动子区基因多态性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(2): 125-127.

[21] 李际盛, 刘奇迹, 王频, 等. 中国山东汉族人群TIM-3基因启动子区域两单核苷酸多态与支气管哮喘的相关性[J]. 山东大学学报: 医学版, 2006, 44(11): 1159-1163.

(收稿:2012-07-26;修回:2012-09-07)

(编辑 王红)