

网络出版时间: 2020-3-30 17:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.022.html>

TRPV1 基因多态性与新疆汉族、哈萨克族 儿童哮喘相关性研究

付朋鸽, 尹晓文

摘要 目的 探讨 TRPV1 基因 rs150846、rs8065080 两位点单核苷酸多态性 (SNPs) 与新疆汉族、哈萨克族儿童哮喘的相关性。方法 选取哮喘儿童 99 例作为病例组, 其中哈萨克族 52 例, 汉族 47 例, 另选取 77 例儿童作为对照组, 其中哈萨克族 39 例, 汉族 38 例。提取静脉血 DNA, 采用 Massarray SNP 分型方法检测 TRPV1 基因的两位点多态性。结果 ① 病例组与对照组在 rs150846 位点的基因型及等位基因频率分布比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 rs8065080 位点的基因型及等位基因频率分布比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。② 哈萨克族病例组与对照组在 rs150846 位点的基因型及等位基因频率分布比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); A 等位基因携带者发生哮喘的危险性为 G 等位基因携带者的 1.941 倍 (95% CI: 1.037 ~ 3.636); 在 rs8065080 位点基因型及等位基因频率分布比较,

差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。③ 汉族病例组与对照组在 rs150846、rs8065080 位点的基因型频率分布比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 TRPV1 基因的 rs150846 位点多态性可能与哈萨克族儿童哮喘易感性有关。

关键词 TRPV1; 基因多态性; 汉族; 哈萨克族; 哮喘
中图分类号 R 725.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0437-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.022

哮喘是一种较常见的呼吸系统疾病, 我国城区 0 ~ 14 岁儿童哮喘总患病率为 3.02%^[1], 89.66% 的儿童哮喘第 1 次喘息发生在 7 岁以内^[2]。该疾病易常年反复发作, 严重影响患儿身心健康及生长发育, 也对家庭及社会造成一定的经济负担。

哮喘是感染、环境及遗传等因素共同作用造成。个体呼吸道易感性可能与遗传有关。在以色列国家对 13 ~ 14 岁学龄儿童进行全国调查, 发现与阿拉伯儿童相比, 犹太儿童哮喘患病率显著升高^[3], 提示哮喘在不同种族之间可能存在一定差异。瞬时感受

2020-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 21567024)

作者单位: 石河子大学医学院第一附属医院儿科, 石河子 832002

作者简介: 付朋鸽, 女, 硕士研究生;

尹晓文, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lu-jiaying_2009@163.com

The SENEX gene promotes proliferation and recurrence of DLBCL by activating the Rb/E2F1 pathway

Wanyan Zhixiang, Wang Jiyu, Pan Ying, et al

(Dept of Hematology, The Second Affiliated Hospital of Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression of SENEX in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and its effect on the recurrence of DLBCL and its possible mechanism. **Methods** Western blot and qRT-PCR were used to detect SENEX gene and protein expression in 3 patients with newly diagnosed DLBCL (newly diagnosed group), 3 patients with relapsed DLBCL (recurrent group) and 3 patients with complete remission of DLBCL (complete remission group). SENEX in DLBCL cell OCI-LY8 were silenced with SiRNA transfection technology and the efficiency of transfection was verified by Western blot and qRT-PCR. The cell proliferation was measured by the CCK-8 analysis. The concentration of free transcription factor binding to the adenovirus E2 promoter (E2F) in cell supernatant was measured by ELISA. Western blot was used to detect expression of p16 and retinoblastoma (Rb) /phosphorylation retinoblastoma (pRb). **Results** SENEX and protein levels increased significantly in patients with relapsed DLBCL; SENEX expression in silencing DLBCL cells inhibited the proliferation of DLBCL cells, E2F activation and Rb activation. **Conclusion** The SENEX gene promotes proliferation and recurrence of DLBCL by activating the Rb/E2F1 pathway.

Key words SENEX; Rb/E2F; DLBCL; proliferation; relapse

器电位香草酸受体 1 (transient receptor potential vanilloid, TRPV1) 基因与呼吸系统疾病易感性的关系正处于研究阶段。研究^[4]表明,北京地区高表达 TRPV1 儿童患哮喘的危险性是低表达儿童的 1.80 倍;Cantero-Recasens et al^[5]研究称 TRPV1-I585V (rs8065080) 变异基因携带者患哮喘风险较低。该研究旨在探讨 TRPV1 基因的 rs150846、rs8065080 位点单核苷酸多态性 (SNPs) 与新疆地区汉族、哈萨克族儿童哮喘关系,以了解新疆哈萨克族儿童哮喘的遗传易感性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2016 年 9 月~2019 年 3 月在新疆伊犁哈萨克自治州尼勒克县人民医院、石河子大学医学院第一附属医院、新疆维吾尔自治区人民医院儿科住院及门诊就诊的哮喘患儿 99 例,纳入病例组。另选取同期在这几家医院进行体检儿童 77 例作为对照组。本研究经医院医学伦理学委员会批准通过,征得受试儿童家长同意。

1.2 研究方法

1.2.1 纳入标准及排除标准 病例组符合《儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016 年版)》^[6] 有关标准。排除标准:①患有喉软骨发育不良、支气管肺发育不良、支气管异物等的儿童;②患有先天性心脏病及其他先天畸形的儿童;③早产儿、足月小样儿、免疫缺陷儿童。对照组既往无哮喘病史的健康儿童。排除标准:①患湿疹、过敏性鼻炎、长期腹泻等变应性疾病儿童;②先天性心脏病及其他先天性畸形儿童;③合并其他严重内外科疾病的儿童。

1.2.2 DNA 的提取 抽取所有受试儿童的外周静脉血 2 ml,置于含 2% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝剂的一次性采血管中,并放置于 -80 °C 冰箱中保存备用;常温解冻后,采用北京 TIANGEN 生化科技公司提供的离心柱型血液基因 DNA 提取试剂盒提取 DNA,于 -20 °C 冰箱保存备用。采用紫外分光光度计对 DNA 浓度及纯度进行检测,记录 DNA 浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。DNA 样本取 1 µl,1% 琼脂糖凝胶电泳对其进行质量检测,观察 DNA 条带荧光强度,判断 DNA 浓度及纯度是否符合后续试验要求。见图 1。

1.2.3 rs8065080、rs150846 位点多态性检测 采用 Massarray SNP 分型技术进行两位点多态性检测。①引物设计与合成 rs8065080 位点引物序列:上游 5'-ACGTTGGATGGACCAAGCTCATTACCTGTG-3', 下游 5'-ACGTTGGATGATGATCCTGAGAGACCTG-

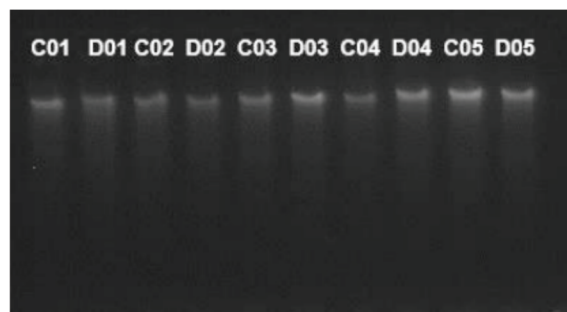


图1 部分 DNA 样本的凝胶电泳图

TG-3'; rs150846 位点引物序列:上游 5'-ACGTTG-GATGATGTAACAGGGACAGTGGAG-3', 下游 5'-ACGTTGGATGGGAGTAGGAGGGTGAAGTTTC-3'; 由北京华大基因公司合成。②PCR 扩增反应:反应体系包含:1.850 µl 灭菌 HPLC 级水,0.625 µl 1.25 × PCR Buffer,0.325 µl MgCl₂,0.1 µl dNTP Mix,1 µl Primer Mix,0.5 U HotStar Taq,1 µl DNA 样本。PCR 扩增条件:预变性 94 °C、3 min,循环条件:94 °C、20 s,56 °C、30 s,72 °C、1 min,45 个循环后 72 °C 延伸 3 min,4 °C 保温。③测序和分型结果:样本经 SAP 处理、延伸反应、产物纯化,进行芯片点样及质谱检测;使用 MassARRAY Typer 4.0 软件获取数据。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,偏态分布的计量资料用中位数(四分位间距)表示,组间比较用秩和检验。病例组和对照组基因型、等位基因频率的比较采用 χ^2 检验;以比值比 (OR) 及 95% 可信区间 (95% CI) 表示相对危险度。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象一般情况 病例组共 99 例,男性 57 例,女性 42 例;哈萨克族 52 例,汉族 47 例,中位数年龄 48 (36~80) 月。对照组共 77 例,男性 43 例,女性 34 例;哈萨克族 39 例,汉族 38 例,中位数年龄 60 (36~96) 月。病例组及对照组儿童在性别构成比 ($\chi^2 = 0.053$, $P = 0.818$)、年龄 ($Z = -0.614$, $P = 0.530$)、民族分布 ($\chi^2 = 0.061$, $P = 0.805$) 比较,差异均无统计学意义。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验 对照组中 rs150846 位点 ($\chi^2 = 1.589$, $P = 0.452$)、rs8065080 位点 ($\chi^2 = 1.695$, $P = 0.428$) 均符合遗传平衡定律。

2.3 TRPV1 基因多态性频率分布 运用 Massarray SNP 分型方法检测基因位点,部分分型结果散点图,图中 2 个纯合子分型根据产物峰高分别在靠近

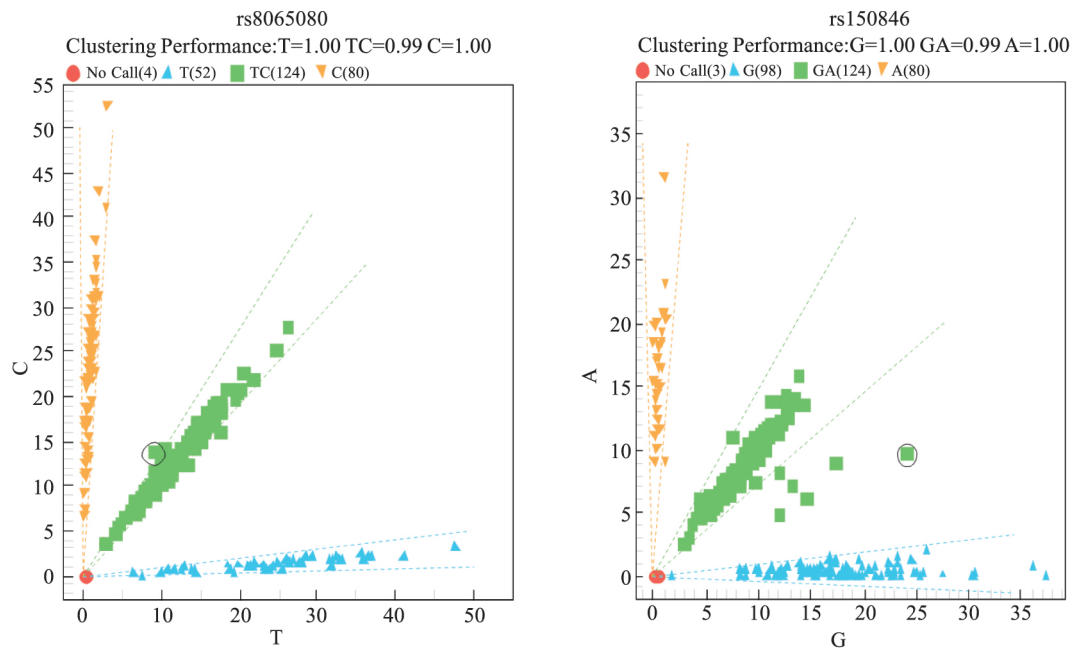


图2 基因型质谱散点图

A: rs8065080; 橙色: 线合子 TT; 蓝色: CC; 绿色: 杂合子 TC; B: rs150846; 橙色: 纯合子 GG; 蓝色: 纯合子 AA; 绿色: 杂合子 GA

横、纵轴聚类,在二者之间单独聚类的一组为杂合子。见图2。病例组与对照组在 rs150846 位点的基因型及等位基因频率分布比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组在 rs8065080 位点的基因型及等位基因频率分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表1。

表1 病例组与对照组 TRPV1 基因两位点基因型及等位基因频率分布 [n (%)]

位点	基因型	病例组	对照组	χ^2 值	P 值
rs150846	AA	14 (14.1)	10 (13.0)	6.996	0.030
	GG	35 (35.4)	42 (54.5)		
	GA	50 (50.5)	25 (32.5)		
	等位基因			3.944	0.047
	A	78 (39.4)	45 (29.2)		
rs8065080	G	120 (60.6)	109 (70.8)	3.900	0.142
	CC	35 (35.4)	18 (23.4)		
	TT	19 (19.2)	13 (16.9)		
	TC	45 (45.5)	46 (59.7)	0.821	0.365
	等位基因				
	T	83 (41.9)	72 (46.8)		
	C	115 (58.1)	82 (53.2)		

2.4 不同民族 TRPV1 基因 rs150846、rs8065080 位点基因型及等位基因频率分布比较 哈萨克族病例组与对照组在 rs150846 位点的基因型及等位基因频率分布比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);

以 G 等位基因作为参照, A 等位基因携带者发生哮喘的危险性为 G 等位基因携带者的 1.941 倍 (95% CI: 1.037 ~ 3.636)。哈萨克族病例组与对照组在 rs8065080 位点基因型及等位基因频率分布比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表2。汉族病例组与对照组在 rs150846、rs8065080 位点的基因型分布比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表3。

3 讨论

TRPV1 基因位于人类染色体 17p13 区域,是瞬时受体电位离子通道蛋白 (transient receptor potential channel, TRP) 超家族 V 亚家族成员,由 432 个氨基酸组成,在很多组织及细胞中均有表达,如气管平滑肌细胞、上皮细胞、内皮细胞以及 T 细胞等,它可调节 $CD4^+$ 的活性和炎症细胞的特异性^[7]。有学者^[8]认为,TRPV1 基因与各种细胞因子之间相互影响,从而引起机体免疫紊乱或外周致敏,最终导致哮喘发生。而有实验^[9]表明内毒素诱导的气道炎症的小鼠,在敲除了 TRPV1 基因以后,气道炎症和支气管高反应性均增强。国外研究^[10]显示,TRPV1 受体可能是慢性支气管哮喘的潜在药物靶点,它显著减轻了慢性哮喘小鼠模型中的气道高反应性、气道炎症和重塑。TRPV1 的激动剂可导致咳嗽、支气管收缩、气道微血管渗漏、气道高反应性及气道分泌物增多^[11],由此推测该基因可能与哮喘的发生有

表2 哈萨克族在 rs150846、rs8065080 位点基因型及等位基因频率分布 [$n(\%)$]

位点	病例组	对照组	χ^2 值	P 值	OR(95% CI)
rs150846	基因型				
	AA	9(17.3)	5(12.8)		1
	GG	16(30.8)	22(56.4)	6.127	0.047
	GA	27(51.9)	12(30.8)		0.404(0.114 ~ 1.437)
					1.250(0.345 ~ 4.529)
rs150846	等位基因				
	A	45(43.3)	22(28.2)	4.348	0.037
	G	59(56.7)	56(71.8)		1.941(1.037 ~ 3.636)
rs8065080	基因型				
	CC	17(32.7)	11(28.2)		1
	TT	12(23.1)	9(23.1)	0.243	0.886
	TC	23(44.2)	19(48.7)		0.863(0.273 ~ 2.724)
					0.783(0.296 ~ 2.070)
	等位基因				
	T	57(54.8)	41(52.6)	0.090	0.764
	C	47(45.2)	37(47.4)		1.094(0.607 ~ 1.972)

表3 汉族 rs150846、rs8065080 位点基因型频率分布 [$n(\%)$]

位点	病例组	对照组	χ^2 值	P 值
rs150846	基因型			
	AA	5(10.6)	5(13.2)	
	GG	19(40.4)	20(52.6)	1.871 0.392
rs8065080	基因型			
	GA	23(48.9)	13(34.2)	
	CC	18(38.3)	7(18.4)	
	TT	7(14.9)	4(10.5)	5.275 0.072
rs8065080	TC	22(46.8)	27(71.1)	

关。从遗传学角度出发,探讨遗传因素在儿童哮喘的作用,了解不同民族人群中 TRPV1 基因多态性(SNP)的分布,提示其影响哮喘发生的具体途径和中间环节,为临床诊断等提供理论依据。

目前不同地区、不同人群的 TRPV1 基因多态性与哮喘易感性研究结果不一致。Chen et al^[12]研究表明 TRPV1 表达水平是诱发儿童哮喘的危险因素之一。王强等^[13]研究显示 TRPV1 基因多态性是影响北京地区儿童哮喘的重要遗传因素;Zhang et al^[14]认为 TRPV1 的 mRNA 水平和 SNP 位点都可能是儿童哮喘的预测因子。关于 TRPV1 基因多态性与新疆不同民族儿童哮喘相关性的研究尚罕见报道。rs8065080、rs150846 两位点均属于 TRPV1 基因编码区;rs150846 A/G 突变属于 TRPV1 基因编码区的内含子突变。研究^[15]显示,该位点突变可能与无哮喘者发生夜间咳嗽的危险性增加有关($OR = 1.22$ 95% $CI: 1.05 \sim 1.41$)。而该研究表明在哈萨克族 rs150846 位点的基因型频率 AA、GG、GA 及等位基因 A、G 比较,差异均有统计学意义,提示 TRPV1 基因的 rs150846 位点多态性可能与哈萨克族儿童哮喘易感性有关,A 等位基因携带者可能增加

患哮喘的风险;而在汉族病例组和对照组中基因型及等位基因频率分布均无差异,这提示 rs150846 基因多态性与新疆地区儿童哮喘可能存在民族差异。rs8065080 位于 TRPV1 基因的第 15 个外显子,该基因位点的 C/T 突变在蛋白水平表现为缬氨酸突变为异亮氨酸。本研究表明该基因位点多态性与新疆汉族、哈萨克族儿童哮喘均无相关性,这与 Cantero-Recasens et al^[5]的研究不同,可能与不同地区人口分布、环境等因素均有关。

综上所述,该研究对 TRPV1 基因 rs150846、rs8065080 位点单核苷酸多态性与新疆汉族、哈萨克族儿童哮喘的相关性进行探讨,表明 TRPV1 基因的 rs150846 位点基因多态性与哈萨克族儿童哮喘易感性相关,与汉族儿童无关;而 rs8065080 位点基因多态性与汉族、哈萨克族儿童哮喘易感性无关。

参考文献

- [1] 全国儿科哮喘协作组. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 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): 729-35.
- [2] 魏琳, 张玉娥, 金惠娣, 等. 反复喘息患儿 1035 例随访分析[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(6): 532-5.
- [3] Shohat T, Green M S, Davidson Y, et al. Differences in the prevalence of asthma and current wheeze between Jews and Arabs: results from a national survey of schoolchildren in Israel[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002, 89(4): 386-92.
- [4] 朱泽轶, 冯佳, 李红, 等. 北京地区哮喘儿童特异性 IgE 和 TRPV1/2 mRNA 表达水平分析[J]. 军事医学, 2011, 35(8): 616-9.
- [5] Cantero-Recasens G, Gonzalez J R, Fandos C, et al. Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma[J]. J Biol Chem, 2010, 285(36): 27532-5.

- [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):167-81.
- [7] Baker K, Raemdonck K, Dekkx B, et al. Role of the ion channel, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), in allergic asthma [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1):67.
- [8] 张建华, 金雯雯, 张宁, 等. TRPV1及相关细胞因子对儿童支气管哮喘调控及中药调控作用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(7):1155-9.
- [9] Helyes Z, Elekes K, Németh J, et al. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in endotoxin-induced airway inflammation in the mouse [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 292(5):L1173-81.
- [10] Choi J Y, Lee H Y, Hur J, et al. TRPV1 blocking alleviates airway inflammation and remodeling in a chronic asthma murine model [J]. *Allergy Asthma Immunol Res* 2018, 10(3):216-24.
- [11] Firth A L, Remillard C V, Yuan J X. TRP channels in hypertension [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(8):895-906.
- [12] Chen C L, Li H, Xing X H, et al. Effect of TRPV1 gene mutation on bronchial asthma in children before and after treatment [J]. *Allergy Asthma Proc*, 2015, 36(2):29-36.
- [13] 王强, 白雪涛, 徐东群, 等. TRPV1基因多态性和室内空气污染与儿童哮喘关系的病例对照研究[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(7):569-73.
- [14] Zhang J, Zhou Z, Zhang N, et al. Establishment of preliminary regulatory network of TRPV1 and related cytokines [J]. *Saudi J Biol Sci* 2017, 24(3):582-8.
- [15] Smit L A, Kogevinas M, Antó J M, et al. Transient receptor potential genes, smoking, occupational exposures and cough in adults [J]. *Respir Res*, 2012, 13(1):26.

Relationship between TRPV1 gene polymorphism and childhood asthma of Kazakh and Han in Xinjiang

Fu Pengge, Yin Xiaowen

(Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002)

Abstract Objective To explore the relationship of two single nucleotide polymorphisms (SNPs), rs150846 and rs8065080, of TRPV1 gene with childhood asthma of Kazakh and Han in Xinjiang. **Methods** The participants enrolled were 99 inpatients and outpatients (case group) who received treatment of Pediatrics, including 52 Kazakhs and 47 Hans. 77 healthy controls (control group) underwent physical examination, including 39 Kazakhs and 38 Hans. All the children were taken 2 ml of peripheral venous blood, and DNA of the blood sample was extracted. The Massarray SNP typing technique was used to detect the polymorphisms of TRPV1 gene in peripheral venous blood cells. **Results** ① The patterns of genotype and allele frequencies of rs150846 at the TRPV1 locus had statistical difference between the groups ($P < 0.05$), but the patterns of genotype and allele frequencies of rs8065080 at the TRPV1 locus did not differ significantly between the groups ($P > 0.05$). ② Among the Kazakh population, the patterns of genotype and allele frequencies of rs150846 at the TRPV1 locus had statistical difference between the groups ($P < 0.05$). The allele A of rs150846 had a 1.941-fold (95% CI: 1.037 ~ 3.636) increased risk of developing asthmatic diseases compared with those who had allele G. But the patterns of genotype and allele frequencies of rs8065080 at the TRPV1 locus did not differ significantly between the groups ($P > 0.05$). ③ Among the Han population, the patterns of genotype and allele frequencies of rs150846 and rs8065080 at the TRPV1 locus did not differ significantly between the groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The rs150846 gene polymorphism of TRPV1 gene could be associated with susceptibility to childhood asthma of Kazakh in Xinjiang.

Key words TRPV1; gene polymorphism; Han; Kazakh; asthma