·论　　著·　　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2018.16.013

MBL 启动子区－221 位点的多态性和血清 MBL、白细胞介素 17 水平与儿童支气管炎伴喘息的相关性研究*

朱朝阳[1]，董　青[2]，董言斌[3]，苏保宁[1△]

（1.江苏省连云港市东方医院儿科　222000；2.江苏省连云港市卫生和计划生育委员会　222000；
3.江苏省连云港市东方医院临床研究与转化医学中心　222000）

摘　要：目的　探讨甘露糖结合凝集素（MBL）启动子区－221 位点的多态性及血清 MBL、白细胞介素（IL）-17 在支气管炎伴喘息儿童诊断中的价值。**方法**　将研究对象分为既往喘息 1 次（喘 1 组）、既往喘息 2 次（喘 2 组）和健康对照组，每组各 30 例，通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术检测 MBL 启动子区－221 位点的多态性，同时用酶联免疫吸附试验测定血清 MBL、IL-17 水平。**结果**　MBL 启动子区－221 位点的 CC 基因型频率在健康对照组最高，喘 2 组最低，3 组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；GG 基因型频率在健康对照组中最低，喘 1 组、喘 2 组的频率相同，3 组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。血清 MBL 在健康对照组中最高，喘 1 组次之，喘 2 组最低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；血清中 IL-17 在喘 1 组和喘 2 组水平高于健康对照组，血清 IL-17 在喘 2 组中高于喘 1 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**　MBL 启动子区－221 位点的基因型频率多态性与儿童喘息无相关性；血清 MBL、IL-17 的检测在喘息儿童的诊断中具有一定的临床意义。

关键词：支气管炎；　甘露聚糖结合凝集素；　白细胞介素 17；　喘息；　基因频率

中图法分类号：R272.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2018)16-2401-04

Correlation study between polymorphism of the locus of MBL promoter－221，MBL and IL-17 in children with asthmatic bronchitis*

ZHU Zhaoyang[1]，*DONG Qing*[2]，*DONG Yanbin*[3]，*SU Baoning*[1△]

（1. *Department of Pediatric，Lianyungang Oriental Hospital，Lianyungang，Jiangsu* 222000，*China*；
2. *Lianyungang Municipal Commission of Health and Family Planning，Lianyungang，Jiangsu* 222000，*China*；3. *Clinical Research and Translational Medicine Center，Lianyungang Oriental Hospital，Lianyungang，Jiangsu* 222000，*China*）

Abstract：Objective　To investigate the polymorphism of locus MBL promoter region－221 and the value of serum mannose-binding lectin（MBL）and interleukin-17（IL-17）in the diagnosis of children with asthmatic bronchitis. **Methods**　The subjects were divided into 3 groups：the first wheezing group（group 1），the second wheezing group（group 2）and the control group，30 cases in each group. Polymorphism at position of MBL promoter region－221 by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism（PCR-RFLP）and serum MBL and IL-17 levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）. **Results**　The genotype frequency of CC genotype at MBL promoter region－221 was highest in the healthy control group and lowest in group 2，there was no significant difference among the three groups（$P>0.05$）. The frequency of GG genotype frequency was lowest in healthy control group，the frequency of group 1 and group 2 were the same，there was no significant difference among three groups（$P>0.05$）. Serum MBL was highest in the healthy control group，followed by the group 1 and the lowest in the group 2. The difference was statistically significant（$P<0.05$）. The levels of serum IL-17 in the group 1 and group 2 were higher than those of the healthy control group，serum IL-17 in group 2 was higher than group 1，the difference was statistically significant（$P<0.05$）. **Conclusion**　Genotype frequency polymorphism of the locus in MBL promoter region－221 is not associated with childhood wheezing. The detection of serum MBL and IL-17 has certain clinical significance in the diagnosis of children with asthmatic bronchitis.

Key words：bronchitis；　mannose-binding lectin；　interleukin-17；　asthma；　gene frequency

---

*　**基金项目：**江苏省连云港市卫生和计划生育委员会课题（2016025）。

作者简介：朱朝阳，男，医师，主要从事儿科学方面的研究　△　**通信作者**，E-mail：sbn7821@sina.com。

支气管炎是儿童常见的下呼吸道疾病之一。由于儿童特殊的生理病理特点，支气管炎发作时常伴有喘息，喘息次数的增加会导致哮喘发作倾向的增加。支气管炎伴有喘息儿童部分最终转变为哮喘儿童的机制仍然不清楚[1]。甘露糖结合凝集素(MBL)是先天性免疫的重要成分，其血清水平受个体基因型的影响，MBL 降低可以导致多种疾病[2]，尤其与感染性疾病的发生发展密切相关。白细胞介素(IL)-17 作为新型促炎细胞因子，可以诱导某些趋化因子产生，如 IL-6、IL-8、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等，可有效介导组织炎性反应[3]。本研究通过检测 MBL 启动子区－221 位点的多态性、血清 MBL、IL-17 水平的变化，探讨其在支气管炎伴有喘息儿童发作中的重要作用和临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取连云港市东方医院 2016 年 1 月至 2017 年 5 月诊断为支气管炎伴有喘息症状的住院儿童，按既往喘息次数进行分组，既往喘息 1 次(喘 1 组)：共 30 例，其中男 16 例，女 14 例；年龄 1 岁 4 个月至 3 岁 6 个月，平均月龄(19.8±5.8)个月；既往喘息 2 次(喘 2 组)：共 30 例，其中男 17 例，女 13 例；年龄 1 岁 6 个月至 3 岁 7 个月，平均月龄(21.3±5.9)个月；健康对照组：随机选取 30 例同期健康儿童，其中男 15 例，女 15 例，年龄 1 岁 6 个月至 4 岁 8 个月，平均月龄(26.1±8.4)个月。3 组研究对象的一般临床资料比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 1。

表 1 3 组一般资料比较

组别	n	男/女 (n/n)	年龄 (月，$\bar{x}\pm s$)	呼吸 (次/分，$\bar{x}\pm s$)	脉搏 (次/分，$\bar{x}\pm s$)	体质量 (kg，$\bar{x}\pm s$)	出生体质量 (kg，$\bar{x}\pm s$)
喘 1 组	30	16/14	19.8±5.8	22.65±5.04	96.85±9.07	12.37±1.94	2.965±1.197
喘 2 组	30	17/13	21.3±5.9	23.35±5.38	93.74±8.24	12.52±1.52	2.935±0.171
健康对照组	30	15/15	26.1±8.4	25.34±4.63	98.56±9.35	12.95±2.12	2.942±0.146
P		0.861	0.493	0.576	0.694	0.821	0.479

1.2 纳入与排除标准 纳入标准：参考《诸福棠实用儿科学(第 8 版)》中支气管炎诊断标准[4]。(1)发病大多有上呼吸道感染症状，也可突然出现频繁而较深的干咳，以后渐有支气管分泌物；(2)在胸部可闻及干湿啰音，以不固定的干啰音为主，可限于一侧；(3)症状轻者无明显病容，重者发热 38～39 ℃，偶尔达 40 ℃，多 2～3 d 退热；(4)咳嗽一般延续 7～10 d，有时迁延 2～3 周，或反复发作。同时，支气管炎伴有喘息发作参考《诸福棠实用儿科学(第 7 版)》中喘息性支气管炎诊断标准[5]：(1)年龄≥1 岁且年龄≤5 岁，男女不限，喘息呈反复发作，每年少于 2 次；(2)继发上呼吸道感染后，发作时双肺闻及呼气相为主的哮鸣音，呼气相延长；(3)经治疗 5～7 d 后喘息症状明显减轻；(4)部分病例反复发作与感染有关；(5)近期预后大多良好。排除标准：(1)年龄＜1 岁或年龄＞5 岁；(2)结核、支气管炎异物等引起喘息发作的疾病；(3)发作次数大于 3 次/年。

1.3 仪器与试剂 迷你离心机 MN100，台式低速离心机 scilogex-D1008，电子天平 METTLER A1104，－80 ℃超低温冰箱 Thermo-705，电泳仪 MP-300V，凝胶成像分析仪 Tanon-2500，梯度实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR) K960，超微量分光光度计 Nano-100，离心机 scilogex-D3024R，酶标板脱水仪 KS-Ⅰ，酶标洗板机 HBS-4009，恒温箱 HPX-9052MBE，数显水浴恒温振荡器 THZ-82，酶标仪 UVRSAmax (MD)，恒温金属浴 MD-O2N。Human MBL 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒、Human IL-17 ELISA 检测试剂盒、全血基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司；DNA Polymerase、dNTP、DNA Marker、琼脂糖粉、溴化乙啶均购于大连宝生物公司；PCR 引物购于上海生工生物工程股份有限公司。

1.4 方法 3 组研究对象于入院后采集空腹静脉血 1～3 mL，将 1/2 血液放入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝无菌收集管中，置于－80 ℃冰箱保存备用，留取的标本尽量不要反复冻融，以免影响 DNA 提取；将另外 1/2 血液立即置于不加任何抗凝剂的干燥试管，于水浴箱 37 ℃水浴 1 h，后予以 3 000 r/min 离心 10 min，分离血清置于无菌 EP 管内，放置－20 ℃冰箱保存备用。

1.4.1 全血 DNA 提取 取出全血标本，加入 20 μL Proteinase 溶液，混匀。加入缓冲液 GB，充分颠倒混匀，56 ℃放置 10 min。加无水乙醇，充分颠倒混匀，将所得溶液和沉淀物都加入到吸附柱 CB3 中，12 000 r/min 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。向吸附柱中加入缓冲液 GD(需要无水乙醇配置好备用)，12 000 r/min 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。向吸附柱 CB3 中加入 600 μL 漂洗液 PW，12 000 r/min 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。

12 000 r/min 离心 2 min，倒掉废液，将吸附柱 CB3 打开室温放置 10 min，12 000 r/min 离心 30 s，将吸附柱 CB3 转入 1.5 mL 离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴入 120 L 洗脱缓冲液 TB，或者超纯水，室温放置 5 min，12 000 r/min 离心 2 min，将溶液收集到离心管中。收集到 DNA 片段，利用微量核酸分析仪检测所测样本的 DNA 浓度和纯度，光密度（*OD*）260/280 为 1.6～1.8，说明提取的 DNA 纯度较高，DNA 浓度（μg/mL）＝*OD*260 值（DNA 在波长 260 nm 处为最大吸收值）×50 g/mL×稀释倍数。样本置于－20 ℃冰箱保存以备后续使用。

1.4.2 MBL 基因扩增及启动子区－221 位点基因型频率的分布　（1）引物设计和限制性内切酶的确定：MBL 启动子区－221 位点存在 C/G 的等位基因频率分布的差异，利用 primer5.0 软件及参考文献，设计 2 对特异性引物[6]，通过反复摸索条件，选择出扩增效果最佳的引物。引物序列如下：上游，5′-TGG GTT GGT GAC TAA GGT-3′；下游，5′-GGT AGG CAC TAT GAT GAG C-3′。选用特定的限制性内切酶 BtgI 消化 MBL 启动子区－221 位点扩增产物。内切酶 BtgI 能够识别是 5′-C↓CRYGG-3′序列，如果存在该酶切位点，MBL 启动子区－221 位点扩增片段被切为 98、285 bp 的 2 个片段；不存在该酶切位点时，DNA 扩增片段不能被酶切，片段为 384 bp。（2）扩增体系：PCR 扩增体系设定为 20 μL，10×PCR 缓冲液 2 μL，dNTP（2.5 μmol/L）2 μL，上游引物（10 μmol/L）0.5 μL，下游引物（10 μmol/L）0.5 μL，rTaq DNA 聚合酶 0.125 μL，DNA 模板 0.5 μL，双蒸水 14.5 μL 补足至 20 μL。94 ℃预变性 4 min 后，进行 30 次循环，每个循环条件是 94 ℃条件变性 45 s、56 ℃条件退火 45 s、72 ℃条件延伸 1 min，30 次循环结束后在 72 ℃条件再延伸 10 min。将配制好的反应体系置于集合管中，PCR 扩增仪扩增后，扩增的产物标记清楚后，备 1%琼脂糖凝胶电泳检测。电泳后凝胶成像仪观察扩增效果，然后将目的条带胶回收。回收后产物再进行酶切反应。酶切反应体系如下：PCR 产物 10 μL；BtgI 2 μL；缓冲液 2 μL；双蒸水 6 μL。将以上体系混合后 37 ℃水浴 2 h，再以 1%凝胶电泳成像后检验。酶切产物显示 3 种条带：基因型 CC（384 bp），基因型 GC（98、285、384 bp），基因型 GG（98、285 bp）。

1.4.3 血清 MBL、IL-17 检测　采用天根公司购买人 MBL、IL-17 的 ELISA 试剂盒，具体操作方法见试剂盒说明书，在波长 450 nm 的酶标仪上读取各自 *OD* 值。将结果录入 Excel 表中，以标准品浓度作为横坐标（x），对应 *OD* 值作为纵坐标（y），绘制出标准曲线，按照曲线方程计算各样本浓度。

1.5 统计学处理　所有数据录入 Excel2014，采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析；计数资料以百分数表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 MBL 启动子区－221 位点 SNP 检测结果　各组 CC、CG、GG 基因型的检测结果比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。

表 2　各组基因型比较[*n*（%）]

组别	*n*	CC	GC	GG
健康对照组	30	17(56.7)	9(30.0)	4(13.3)
喘 1 组	30	14(46.7)	11(36.7)	5(16.7)
喘 2 组	30	13(43.3)	12(40.0)	5(16.7)
χ^2			0.848	
P			>0.05	

2.2 各组儿童血清 MBL、IL-17 的水平比较　不同喘息次数儿童血清 MBL 水平与健康对照组相比，差异有统计学意义（$F=16.50$，$P<0.05$）；喘 1 组与喘 2 组儿童血清 MBL 水平之间比较，差异有统计学意义（$t=4.43$，$P<0.05$）；不同喘息次数儿童血清 IL-17 水平与健康对照组相比，差异有统计学意义（$F=9.50$，$P<0.05$）；喘 1 组与喘 2 组儿童血清 IL-17 水平比较，差异有统计学意义（$t=10.43$，$P<0.05$）。Pearson 相关分析显示，MBL 与 IL-17 之间呈负相关（$r=-0.91$，$P<0.05$）。见表 3。

表 3　各组儿童血清 MBL、IL-17 比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	*n*	MBL(mg/L)	IL-17(ng/L)
健康对照组	30	6.19±0.83	11.31±2.17
喘 1 组	30	4.07±0.93▲	13.42±2.76▲
喘 2 组	30	3.76±0.78*	15.93±3.18*

注：与健康对照组比较，▲$P<0.05$；与喘 1 组比较，* $P<0.05$

3 讨　论

喘息是婴幼儿呼吸道疾病常见的临床表现，主要的发病机制是多种原因导致气道狭窄。引起喘息的疾病很多，主要包括哮喘、毛细支气管炎、喘息性支气管炎等[6-7]。大多学者认为，无论毛细支气管炎还是支气管炎伴有喘息者，喘息发作次数的增加将会导致哮喘倾向的增加。而支气管炎症的出现与机体免疫功能存在密切关系，其中自然免疫和体液免疫均占有重要作用[8]。

从自然免疫方面上来说，在感染早期，体内分泌 MBL 和 C 反应蛋白。MBL 与细菌表面的甘露糖残基结合，然后与丝氨酸蛋白酶结合形成 MBL 相关的丝氨酸蛋白酶（MASP），MASP 继而水解 C4 和 C2 启动后序的酶促连锁反应，产生一系列生物学效应和最终发生细胞溶解作用的补体活化途径，在自然免疫中起重要作用[9]。有研究指出，反复呼吸道感染与血清

MBL 水平密切相关,提示 MBL 下降会导致免疫力降低[10]。人 MBL 基因位点在 10q11.2～q23,基因的变异会导致 MBL 的变化。迄今为止影响 MBL 基因多态性关键位置有 6 个[11],其中启动子区－221 位点区的 G/C 基因频率分布差异是研究热点之一,但关于支气管炎伴有不同喘息次数儿童的研究尚不多。本研究结果显示,MBL 启动子区－221 位点的基因型频率在各组的分布变化,CC 基因型在健康对照组最高,为 56.7%,喘 2 组最低,为 43.3%,3 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);GG 基因型在健康对照组最低,为 13.3%,喘 1、2 组相等,均为16.7%,3 组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。从结果看,MBL 启动子区－221 位点存在基因频率分布的差异性,但各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

血清 MBL 水平在健康对照组最高,喘 1 组次之,喘 2 组最低,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 MBL 缺乏是导致易发感染性疾病的重要因素之一。本研究中 MBL 随着发作次数增多而下降,表明随着喘息次数增多儿童 MBL 具有下降趋势。但 MBL 启动子－221 位点的多态性各组之间差异无统计学意义($P>0.05$),分析原因可能为:(1)决定 MBL 血清水平的有多个位点的多态性变化,启动子区－221 位点只是其中之一;(2)纳入样本量有限,不能完全反映体内 MBL 真实水平变化。

MBL 作用广泛,研究显示,MBL 既具有调节固有免疫功能,还有调节获得免疫的功能,MBL 还可以促进 IL-12 的分泌[12],但关于是否对 IL-17 有影响的报道较少。IL-17 由 T 辅助 17(Th17)细胞产生,是一种新的促炎细胞因子家族,其含有 6 种不同的同种型(IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E 和 IL-17F)[13]。IL-17 作为促炎细胞因子,其可以诱导某些趋化因子、细胞因子、基质金属蛋白酶(MMP)和来自间质和骨髓细胞的抗微生物肽的释放来募集嗜中性粒细胞和单核细胞[14-15]。IL-17 能有效介导中性粒细胞动员的兴奋过程,从而有效介导组织的炎性反应。本研究结果显示,喘 1 组和喘 2 组血清中 IL-17 水平高于健康对照组,喘 2 组血清中 IL-17 水平高于喘 1 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。经 Pearson 相关分析,MBL 与 IL-17 之间呈负相关,提示 MBL、IL-17 均参与了喘息发作的过程,推测患儿喘息发作期间由于炎症因子的释放导致 Th1/Th2 细胞亚群功能失衡,导致喘息的发生,随着喘息次数的增多,气道炎性反应逐渐加重,由非过敏性喘息转变成哮喘的可能性将增加。

本研究的局限在于仅研究了 MBL 启动子区－221 位点的多态性变化,后期需要从其他位点的多态性分析并结合血清水平之间的相关性展开研究。

参考文献

[1] 中华医学会儿科分会呼吸学组,《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):167-181.

[2] 温楚玲. 甘露聚糖结合凝集素与糖尿病的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(4):512-514.

[3] AHMADIKIA K,KORDBACHEH P,SHADPOUR P,et al. Increased urine interleukin (IL)-17 and IL-22 in patients with Candida urinary tract infection[J]. Iran J Kidney Dis,2018,12(1):33-39.

[4] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学(第 8 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:626.

[5] 胡亚美,江载芳,申坤玲,等. 诸福棠实用儿科学(第 7 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:635.

[6] 陈梦施. 湖南省汉族人群 MBL 与 MASP2 基因多态性与相关因素对结核易感性的综合影响研究[D]. 长沙:中南大学,2014.

[7] 卞芳芳,张冲林,甄清,等. 瘦素、IL-17 水平与婴幼儿喘息患儿哮喘预测指数的相关性[J]. 临床肺科杂志,2016,21(10):1853-1855.

[8] 赵冰,潘家华. 学龄前儿童反复喘息相关危险因素 Logistic 回归分析[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(8):1154-1156.

[9] SHI J,ZHU X,XIE M,et al. MBL2 polymorphisms and the risk of asthma:a meta-analysis[J]. Ann Allerg Asthma Im,2016,117(4):417-422.

[10] TAKAHASHI K. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication[J]. Expert Rev Anti Infect Ther,2011,9(12):1179-1190.

[11] NEGI V S,DEVARAJU P,MISRA D P,et al. Mannose-binding lectin (MBL) codon 54 (rs1800450) polymorphism predisposes towards medium vessel vasculitis in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Rheumatol,2017,36(4):837-843.

[12] WANG M,CHEN Y,ZHANG Y,et al. Mannan-binding lectin directly interacts with Toll-like receptor 4 and suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine secretion from THP-1 cells[J]. Cell Mol Immunol,2011,8(3):265-275.

[13] SORBELLO V,CIPRANDI G,STEFANO A D,et al. Nasal IL-17F is related to bronchial IL-17F/neutrophilia and exacerbations in stable atopic severe asthma[J]. Allergy,2015,70(2):236-240.

[14] 张印,崔艺馨,杨明会. 呼吸道变应性炎症相关 Th 细胞因子的研究进展[J]. 中国医药导报,2016,13(16):31-34.

[15] WHITEHEAD G S,WILSON R H,NAKANO K,et al. IL-35 Production by ICOS$^+$ Tregs Reverses Established IL-17-dependent Allergic Airways Disease[J]. J Allergy Clin Immun,2012,129(1):207.

(收稿日期:2017-12-12 修回日期:2018-02-06)