

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.019

GATA3、IL-13 基因多态性和 IL-13 水平与 小儿结核病易感性的关系研究

杨英阁

河南省南阳医学高等专科学校第一附属医院,河南南阳 473052

摘 要:目的 探讨 GATA3、白细胞介素(IL)-13 基因多态性和 IL-13 水平与小儿结核病易感性的关系。
方法 随机选取 2019 年 12 月至 2020 年 12 月在该院诊治的 414 例小儿结核病患者作为观察组,另选取 456 例同期来该院诊治的无肺结核感染的上呼吸道感染患儿作为对照组。提取静脉血 DNA,采用 Taq-man 荧光定量聚合酶链反应技术对 GATA3 基因的 rs422628 位点和 IL-13 基因的 rs20541 位点进行检测,采用酶联免疫吸附试验检测 IL-13 水平。统计不同基因型分布频率,并分析不同单核苷酸多态性基因型与小儿结核病发病的风险关系。**结果** 观察组 rs422628 位点 3 种基因型 TT、TC 和 CC 频率与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),rs20541 位点的 AA 基因型频率与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。遗传模型分析中 rs20541 位点隐性模型的 OR 值为 3.349($P=0.008$),提示携带 rs20541 位点 AA 基因型的儿童患小儿结核病风险较高。同时携带 rs422628 位点 CC 基因型和 rs20541 位点 AA 基因型的儿童患小儿结核病风险较高($OR=28.500, P=0.043$)。观察组血清 IL-13 水平高于对照组($P<0.05$),且携带 rs20541 位点 AA 基因型患儿血清 IL-13 水平高于携带 rs20541 位点 AG 和 GG 基因型患儿($P<0.05$)。**结论** 携带 IL-13 基因 rs20541 位点 AA 基因型的儿童对小儿结核病的易感性较高,患病风险较大。

关键词:GATA3; 白细胞介素-13; 小儿结核病; 基因多态性
中图分类号:R446.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)22-3098-05

Relationship between GATA3, IL-13 gene polymorphism and IL-13 level and susceptibility to tuberculosis in children

YANG Yingge

The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College of Henan Province,
Nanyang, Henan 473052, China

Abstract:**Objective** To investigate the relationship between GATA3, interleukin (IL)-13 gene polymorphism and IL-13 level and the susceptibility to tuberculosis in children. **Methods** A total of 414 children with tuberculosis who were treated in the hospital from December 2019 to December 2020 were randomly selected as the observation group. Another 456 cases of upper respiratory tract infection without pulmonary tuberculosis were selected as the control group. Venous blood DNA was extracted, and the rs422628 locus of GATA3 gene and rs20541 locus of IL-13 gene were detected by Taq-man fluorescence quantitative polymerase chain reaction technology. The level of IL-13 was detected by enzyme linked immunosorbent assay. The distribution frequency of different genotypes was calculated, and the relationship between different single nucleotide polymorphism genotypes and the incidence risk of tuberculosis in children was analyzed. **Results** There were no significant differences in TT, TC and CC genotypes of rs422628 locus between the observation group and the control group ($P>0.05$), and the difference in AA genotype of rs20541 locus between the observation group and the control group was statistically significant ($P<0.05$). In the genetic model analysis, the OR value of the recessive model of rs20541 locus was 3.349 ($P=0.008$), which suggested that children carrying the AA genotype of rs20541 locus had a relatively high risk to tuberculosis. Children with both CC genotype of rs422628 locus and AA genotype of rs20541 locus were at relatively high risk to tuberculosis ($OR=28.500, P=0.043$). The serum level of IL-13 in the observation group was higher than that in the control group ($P<0.05$), and the serum level of IL-13 of children with AA genotype of rs20541 locus was higher than that of children with AG and GG genotypes of rs20541 locus ($P<0.05$). **Conclusion** Children with AA genotype of rs20541 locus of IL-13 gene have relatively high susceptibility and high risk to tuberculosis.

Key words:GATA3; interleukin-13; tuberculosis in children; gene polymorphism

小儿结核病是指 16 岁以下的儿童所患的结核病,与成人结核病一样,也是由结核分枝杆菌引起,结核病在小儿呼吸系统疾病中发病率高达 5%,尤其是在新生儿阶段若治疗不及时极易威胁生命安全^[1-2]。影响小儿结核病的因素较多,除了外界环境的接触外,机体本身的易感性也逐渐成为近年来研究的热点,其中基因多态性能够反映出同种人群对同种疾病的不同患病风险^[3-4]。GATA3-白细胞介素(IL)-13 基因通路被报道与肺部疾病相关,包括哮喘、支气管哮喘等^[5-6],但是关于该基因通路与结核病,尤其是小儿结核病的研究较少。因此,本研究从 2 个关键基因 GATA3 和 IL-13 入手,重点分析其单核苷酸多态性(SNP)与小儿结核病易感性的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2019 年 12 月至 2020 年 12 月于本院诊治的根据 2017 年版《中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断》标准,痰培养抗酸杆菌阳性并结合影像学确诊为肺结核的 414 例小儿结核病患儿作为观察组,另选取 456 例同期来本院诊治的无肺结核感染的上呼吸道感染患儿作为对照组。观察组中,男 242 例,女 172 例;年龄 1~14 岁;平均体质量(33.21±13.21)kg;血压正常 406 例;血糖正常 410 例;发热 411 例。对照组中,男 264 例,女 192 例;年龄 1~14 岁;平均体质量(34.32±14.44)kg;血压正常 432 例;血糖正常 455 例;发热 446 例。所有患儿及家属均了解本研究的情况,并在知情同意书签字。

本研究经本院医学伦理委员会批准。两组性别、年龄、体质量等比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用含乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)的抗凝管采集每例患儿 5 mL 全血。使用 Omega Mag-Binds Forensic DNA Kit 试剂盒(美国 Omega 公司,生产批号:20101109)提取血液的基因组 DNA,完成后用 ND2000 型 nanodrop(美国 Thermo Fisher 公司)测定 DNA 的浓度和纯度,置于-20℃冰箱保存。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR)进行单核苷酸多态性(SNP)分型 使用 Oligo6.0 设计 SNP 位点处的引物序列及其 Taqman 探针序列,见表 1,引物合成由上海生工生物公司完成。将 1 μL 的 DNA 溶液和配制好的 1.2 μL 引物溶液(包括上、下游引物,探针引物各 0.4 μL)加入到预先配制好的 17.8 μL 的 TransStart Probe qPCR SuperMix(北京全式金生物公司)中,轻微振荡混匀,放入 bio-rad CFX96 荧光定量 PCR 仪中,反应条件为 94℃ 3 min;94℃ 15 s,60℃ 30 s,40 个循环。实验结果由仪器自带软件生成。每个样品做 3 个复孔,阴性对照使用焦碳酸二乙酯(DEPC)水,阳性对照使用含有该序列的阳性质粒(由上海生工生物公司合成)。基因型的判定:靠近 FAM 横坐标为野生纯合型,靠近 VIC 纵坐标为突变纯合性,位于靠近 45°线的位置为杂合型。

表 1 SNP 引物序列

SNP	引物序列	探针序列
rs422628	上游:5'-GATGTGGACCACTTGCTAGT-3'	HEX:5'-TCACCCTCTCCTCTCTCCCCACTC-3'
	下游:5'-TGACAGTTCGCACAGGACGTC-3'	FAM:5'-TTACCCTCTCCTCTCTCCCCACTC-3'
rs20541	上游:5'-GTGCGAGTCGTCCCGCCTCT-3'	HEX:5'-GGACAGTTCAACTGAACTTCGA-3'
	下游:5'-CCAGTCCACTTACATTGTGAAG-3'	FAM:5'-GGACGGTTCAACTGAACTTCGAG-3'

1.3 酶联免疫吸附试验检测血清中 IL-13 水平 取观察组患儿的血清约 1 mL,向 96 孔板中滴加标准品。样品孔中加入样品,每个样品 3 个复孔。混匀,用封板膜封板后置 37℃温育 30 min,小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。每孔加入酶标试剂 50 μL,空白孔除外,混匀,用封板膜封板后置 37℃温育 30 min。每孔先加入显色剂 A 50 μL,再加入显色剂 B 50 μL,轻轻振荡混匀,37℃避光显色 15 min 后每孔加终止液 50 μL,终止反应。以空白空调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

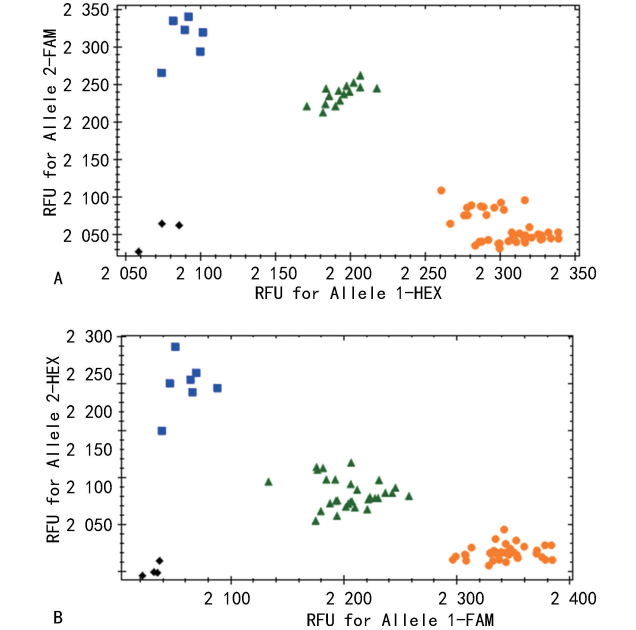
组间比较采用 t 检验;计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。各基因型和患病风险的关系分析采用 Logistic 回归分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GATA3 基因 rs422628 位点和 IL-13 基因 rs20541 位点的基因分型结果及其分布频率 所有待测的患儿均得到了明确的基因分型结果,见图 1。在研究人群中,观察组 GATA3 基因的 rs422628 位点 TT、TC 和 CC 3 种基因型频率与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);观察组 IL-13 基因的 rs20541 位点 GG 和 GA 两种基因型频率与对照组比较差异均无统计学差异($P>0.05$),但是 AA 基因型频

率与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($P>0.05$)。

2.2 rs422628 位点不同模型分析小儿结核病的患病风险 显性模型(TC+CC/TT)的 OR 值为 1.100($P=0.950$),隐性模型(CC/TT+TC)的 OR 值为 1.210($P=0.757$),超显性模型中(TT+CC/TC)的 OR 值为 0.981($P=0.920$)。见表 3。



注:A 为 rs422628 位点的基因分型结果,方形图示为 TT 基因型,圆形图示为 CC 基因型,三角形图示为 CT 基因型;B 为 rs20541 位点的分型结果,圆形图示为 GG 基因型,方形图示为 AA 基因型,三角形图示为 AG 基因型。

图 1 rs422628 和 rs20541 位点的基因分型结果

2.3 rs20541 位点不同模型分析小儿结核病的患病风险 显性模型(AG+AA/GG)的 OR 值为 1.746, $P=(0.057)$,隐性模型(AA/GG+AG)的 OR 值为 3.349($P=0.008$),超显性模型(GG+AA/AG)的 OR 值为 1.018($P=0.944$),见表 4。

2.4 rs422628 和 rs20541 位点联合作用与小儿结核病患病的关系 2 个 SNP 位点同时发生纯合突变的携带 CC 基因型和 AA 基因型的儿童,观察组有 19 例,占 4.6%,对照组有 1 例,占 0.2%,两组比较差异有统计学意义($P=0.043$),与未突变的野生纯合型(TT+GG)比较 OR 值为 28.500。见表 5。

表 2 基因分型的频率分布

基因型/ 等位基因	观察组(<i>n</i> =414)		对照组(<i>n</i> =456)		χ^2	<i>P</i>
	<i>n</i>	占比(%)	<i>n</i>	占比(%)		
rs422628 位点						
TT	288	69.6	319	70.0	0.004	0.950
TC	101	24.4	114	25.0	0.01	0.920
CC	25	6.0	23	5.0	0.096	0.757
T	677	81.8	752	82.5	0.331	0.565
C	151	18.2	160	17.5		
rs20541 位点						
GG	128	30.9	200	43.9	3.609	0.057
AG	207	50.0	226	49.5	0.929	0.335
AA	79	19.1	30	6.6	6.976	0.008
G	463	55.9	626	68.6	3.432	0.064
A	365	44.1	286	31.4		

表 3 rs422628 位点不同遗传模型分析小儿结核病的患病风险

模型	基因型	观察组($n=414$)	对照组($n=456$)	OR(95%CI)	P
显性模型	TT	288(69.6)	319(70.0)	1	0.950
	TC+CC	136(32.9)	137(30.0)	1.100(0.831~1.334)	
隐性模型	TT+TC	389(94.0)	433(95.0)	1	0.757
	CC	25(6.0)	23(5.0)	1.210(1.021~1.546)	
超显性模型	TT+CC	313(75.6)	342(75.0)	1	0.920
	TC	101(24.4)	114(25.0)	0.981(0.751~1.115)	

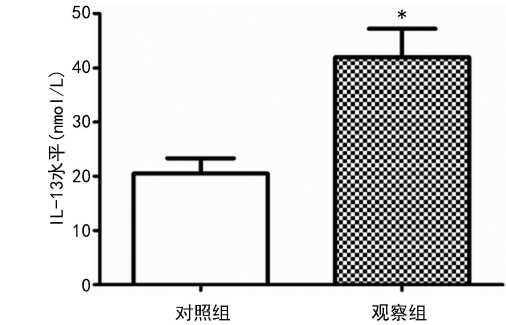
表 4 rs20541 位点不同遗传模型分析小儿结核病的患病风险

模型	基因型	观察组($n=414$)	对照组($n=456$)	OR(95%CI)	P
显性模型	GG	128(30.9)	200(43.9)	1	0.057
	AG+AA	286(69.1)	256(56.1)	1.746(1.235~2.312)	
隐性模型	GG+AG	335(80.9)	426(93.4)	1	0.008
	AA	79(19.1)	30(6.6)	3.349(1.922~5.084)	
超显性模型	GG+AA	207(50.0)	230(50.4)	1	0.944
	AG	207(50.0)	226(49.6)	1.018(0.811~1.318)	

表 5 rs422628 和 rs20541 位点联合作用基因型的频率分布及其 OR 值

基因型	观察组 (n=414)		对照组 (n=456)		OR (95%CI)	P
	n	占比 (%)	n	占比 (%)		
TT+GG	108	26.1	162	35.5	1	0.150
CC+AA	19	4.6	1	0.2	28.500(17.522~32.631)	0.043
TC+AG	35	8.5	41	9.0	1.280(0.803~1.631)	0.195
TC+AA	40	9.7	12	2.6	5.000(3.533~9.468)	0.037
CC+AG	6	1.4	13	2.9	0.692(0.444~1.011)	0.465

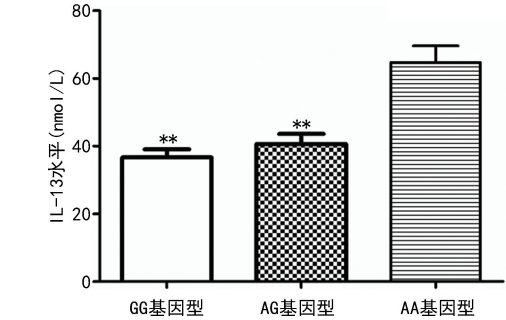
2.5 观察组和对照组 IL-13 水平比较 观察组血清 IL-13 水平高于对照组($P<0.05$),见图 2。



注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 2 两组 IL-13 水平比较

2.6 不同 IL-13 基因分型患儿 IL-13 水平比较 携带 AA 基因型患儿的血清 IL-13 水平高于携带 AG 和 GG 基因型患儿($P<0.05$),见图 3。



注:与 AA 基因型比较, * * $P<0.05$ 。

图 3 不同 IL-13 基因分型患儿 IL-13 水平比较

3 讨 论

小儿结核病是由外界结核分枝杆菌入侵体内造成的,既与外界的环境因素有关,也与自身体质和免疫力相关^[7-8]。目前,关于免疫力的提高,除了养成良好的生活习惯和饮食补充身体必需微量元素外,并无实质性的有效措施。对于 16 岁以下的儿童,免疫力较差,容易受到外界细菌和病毒的侵入,因此,小儿结核病与儿童的免疫力是直接相关的^[9-10]。影响免疫力的因素也有很多,目前受学者广泛关注的是免疫因子信号传递通路的相关研究,免疫因子是免疫系统的直接信使,它们可以通过刺激或激活免疫细胞的活性来杀灭体内入侵的病毒和细菌^[11-12]。

GATA3 属于锌指结构的转录因子,对胸腺的发育和 T 细胞的分化有促进作用,rs422628 位点是 GATA3 基因上的 SNP 突变位点,位于内含子区域,该位点的突变能够影响 GATA3 的转录,从而影响其下游信号分子的表达,使 T 细胞的发育受到影响^[13-14]。有研究表明,GATA-3 在哮喘大鼠肺组织中的表达较高,通过抑制 GATA-3 的表达可减轻新生儿细菌性呼吸道炎症反应^[15]。但是本研究发现,在小儿结核病的易感性方面,观察组 rs422628 位点 TT、TC 和 CC3 种基因型频率与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),显性、隐性和超显性 3 种遗传模型分析差异也均无统计学意义($P>0.05$),表明 GATA3 基因 rs422628 位点多态性与小儿结核病易感性的关联不强。IL-13 主要是由活化的 T 辅助细胞、肥大细胞、嗜碱细胞等细胞分泌,有相关研究表明,IL-13 与支气管哮喘、肺间质纤维化和急性肺损伤均有密切的关系^[16-17]。IL-13 可以阻断肿瘤坏死因子诱导的激活蛋白-1 和核因子 κ B 激活,抑制相关炎症因子的表达,降低炎症因子对细胞的损伤^[18]。此外,IL-13 还可以促进 B 细胞的增殖和分化,以及分泌免疫球蛋白^[19]。rs20541 位点位于 IL-13 基因的编码区,其突变可导致氨基酸由谷氨酰胺变为精氨酸,使 IL-13 基因的结构发生改变,进而影响免疫功能^[20]。本研究发现,携带 AA 基因型的儿童属于小儿结核病的易感人群,隐性模型的 OR 值为 3.349($P=0.008$),提示该类儿童患病风险较高,且携带 AA 基因型儿童抵抗结核分枝杆菌病原入侵的免疫力较差。本研究进一步分析了 rs422628 与 rs20541 位点联合作用与小儿结核病患病的关系,结果显示,虽然 rs422628 位点单独分析时与小儿结核病的易感性并无关联,但是若 rs422628 位点纯合突变型 CC 基因型与 rs20541 位点 AA 基因型同时存在,其 OR 值高达 28.500($P=0.043$),表明 GATA3 基因 rs422628 位点纯合型突变能够在易感性方面起到辅助的促进作用,间接影响机体对结核分枝杆菌的抵抗能力。目前常见成人结核病易感人群血液 IL-13 水平升高的报道,鉴于 IL-13 基因与结核病有较高的易感性关系,本研究进一步分析了血清 IL-13 水平与 IL-13 基因 rs20541 位点各基因型的关

系,结果显示,观察组携带 AA 基因型的患儿血清 IL-13 水平高于携带 AG 和 GG 基因型患儿,进一步证实 IL-13 基因 rs20541 位点 AA 基因型患儿的炎症反应程度更高。

综上所述,携带 IL-13 基因 rs20541 位点 AA 基因型的儿童对小儿结核病的易感性较高,患病风险较大。但是,SNP 位点可能因为人种和样本量的不同存在结果差异和多样化。因此,如果可以获得更大样本量和不同民族、种族的细致划分,会使研究结果更有说服力。

参考文献

- [1] LIMPAPHAYOM N, OSATEERAKUN P, THEAMBOONLERS A, et al. Infantile osteoarticular tuberculosis misdiagnosed as Bacillus Calmette-Guerin related osteomyelitis[J]. SICOT J, 2015, 1: 20.
- [2] BARNARD B W, DU PLESSIS A M, GOUSSARD P, et al. Infantile intrathoracic large airway obstruction in a setting with a high prevalence of tuberculosis/HIV[J]. Paediatr Int Child Health, 2018, 38(2): 106-112.
- [3] CHEN C, ZHAO Q, SHAO Y, et al. A common variant of ASAP1 is associated with tuberculosis susceptibility in the Han Chinese population[J]. Dis Markers, 2019, 2019: 7945429.
- [4] FARHAT M R, FRESCHI L, CALDERON R, et al. Murray M14. GWAS for quantitative resistance phenotypes in Mycobacterium tuberculosis reveals resistance genes and regulatory regions[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2128.
- [5] RABY B A. Asthma severity, nature or nurture: genetic determinants[J]. Curr Opin Pediatr, 2019, 31(3): 340-348.
- [6] WANG N, YANG R R, CHEN M K, et al. Establishment of a fluorescent PCR melting curve method for detecting asthma susceptibility using gene SNP typing[J]. J Asthma, 2019, 13: 1-12.
- [7] DEY A, SHAH I. Infantile endobronchial tuberculosis[J]. J Family Med Prim Care, 2019, 8(1): 299-301.
- [8] ARCÊNCIO R A, DE ALMEIDA C J, TOUSO M M, et al. Preliminary validation of an instrument to assess social support and tuberculosis stigma in patients' families[J]. Public Health Action, 2014, 4(3): 195-200.
- [9] COLOMBA C, DI CARLO P, GUADAGNINO G, et al. A case of epididymo-orchitis after intravesical bacille calmette-guérin therapy for superficial bladder carcinoma in a patient with latent tuberculosis infection[J]. Infect Agent Cancer, 2016, 11: 25.
- [10] COLOMBA C, ADAMOLI L, TRIZZINO M, et al. A case of visceral leishmaniasis and pulmonary tuberculosis in a post-partum woman[J]. Int J Infect Dis, 2015, 33: 5-6.
- [11] KIM J H, YOON J E, NIKAPITIYA C, et al. Small heterodimer partner controls the virus-mediated antiviral immune response by targeting CREB-binding protein in the nucleus[J]. Cell Rep, 2019, 27(7): 2105-2118.
- [12] WANG K, MA H, LIU H, et al. The glycoprotein and nucleocapsid protein of hantaviruses manipulate autophagy flux to restrain host innate immune responses[J]. Cell Rep, 2019, 27(7): 2075-2091.
- [13] TAKASHIMA Y, KAWAGUCHI A, HAYANO A, et al. CD276 and the gene signature composed of GATA 3 and LGALS3 enable prognosis prediction of glioblastoma multiforme[J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216825.
- [14] RODRÍGUEZ-GÓMEZ I M, TALKER S C, KÄSER T, et al. Expression of T-Bet, eomesodermin, and GATA-3 correlates with distinct phenotypes and functional properties in porcine $\gamma\delta$ T cells[J]. Front Immunol, 2019, 10: 396.
- [15] AIERKEN A, XU P. Bacterial respiratory tract inflammation in neonatal rat model is attenuated by benzofuran through inhibition of GATA3[J]. Microb Pathog, 2018, 125: 313-317.
- [16] CHIANG S R, LIN C Y, CHEN D Y, et al. The effects of human parvovirus VP1 unique region in a mouse model of allergic asthma[J]. PLoS One, 2019, 14(5): e0216799.
- [17] KRINGS J G, MCGREGOR M C, BACHARIER L B, et al. Biologics for severe asthma: treatment-specific effects are important in choosing a specific agent[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2019, 7(5): 1379-1392.
- [18] MAEDA D, KUBO T, KIYA K, et al. Periostin is induced by IL-4/IL-13 in dermal fibroblasts and promotes RhoA/ROCK pathway-mediated TGF- β 1 secretion in abnormal scar formation[J]. J Plast Surg Hand Surg, 2019, 8: 1-7.
- [19] ZHANG N, CHEN Y, LI S, et al. Multiple exposure to environmental factors and variations in CYP27B1 and the microRNA-binding site of IL-13 are associated with breast cancer risk[J]. Cancer Med, 2019, 8(6): 3237-3249.
- [20] WANG R, QIN H M, LIAO B Y, et al. Genetic polymorphisms in interleukin 13 gene with the susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population[J]. Cytokine, 2019, 115: 121-126.

(收稿日期: 2021-12-06 修回日期: 2022-05-10)